



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Bioecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e fatores de risco para a presença de vetores de *Leishmania* spp., no Alentejo, Portugal, e na Mesoregião Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

**Sara Margarida Filipe Pereira**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,  
ESPECIALIDADE PARASITOLOGIA MÉDICA**

**OUTUBRO, 2019**



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Bioecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e fatores de risco para a presença de vetores de *Leishmania* spp., no Alentejo, Portugal, e na Mesoregião Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

**Sara Margarida Filipe Pereira**

**Orientador: Professora Doutora Maria Odete Afonso**

**Coorientador: Investigador Doutor Maurício Luíz Vilela**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas

Artigos publicados e comunicações em congressos nacionais e internacionais

De acordo com o Regulamento de apresentação ao IHMT/UNL de Dissertação/Tese para obtenção do Grau de Doutor (3º ciclo), Conselho Científico (CC) de 16 de novembro de 2017, insere-se, antes da Dedicatória, os elementos bibliográficos resultantes da dissertação, i.e., artigos publicados e comunicações em congressos.

Artigos publicados:

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2017. First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal, *Acta Tropica*, 174:45-48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020>

Comunicações em congressos nacionais e internacionais:

Nacionais

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2016. Bioecologia de flebotomíneos e fatores de risco para a presença de vetores de *Leishmania* spp., no Alentejo, Portugal, e na Mesoregião Sul Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. *VII Jornadas Científicas do IHMT/UNL*, 12 de dezembro. Comunicação oral, *Abstract book*: 16.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2017. Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania* sp., capturados no Velho e no Novo Mundo: Alentejo, Portugal e Volta Redonda, Brasil, 2016-2017. *VIII Jornadas Científicas do IHMT/UNL*, 12 de dezembro. Comunicação sob formato de poster, *Abstract book*: 11.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Ferrolho, J., Gomes, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2018. A ocorrência atual de

espécies flebotomínicas, suspeitas ou vetoras de *Leishmania* sp., no Alentejo, Portugal, e no Município de Volta Redonda, Brasil. *IX Jornadas Científicas do IHMT/UNL*, 12 de dezembro. Comunicação sob formato de poster, *Abstract book*:19.

Internacionais:

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2017. First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, Southern Portugal. *6th World Congress on Leishmaniasis*, Toledo, Spain, 16 a 20 de maio. Comunicação sob format de poster, *Abstract book*: 649.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2018. Epidemiological aspects of Phlebotomine sand fly species, *Leishmania* vectors, from Old and New World. *28<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Parasitology*, 18 a 23 de março, Berlin, Germany. Comunicação oral, *Abstract book*: 154.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T.A., Britto, C., Ferrolho, J. Vilhena, M., Rodrigues, J.S., Baêta, B., Ferreira, S.G., de Santana, A.L.F., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2018. Estudo ecoepidemiológico em áreas de ocorrência de Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil, utilizando abordagens moleculares, tendo como foco o parasito e o vetor. *54<sup>o</sup> Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (MedTrop, 2018)*, 2 a 5 de setembro, Pernambuco, Olinda, Brasil. Comunicação sob formato de poster *Abstract book*:257.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Gomes, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2018. Actual occurrence of proven or suspected sand fly species, vectors of *Leishmania* sp., in Alentejo, Portugal and Volta Redonda, Brazil. *1st International Caparica Congress on Leishmaniasis*, 29 a 31 de outubro, Caparica, Portugal. Comunicação oral, *Abstract book*: 143.

*Tudo vale a pena se a alma não é pequena*

Fernando Pessoa

## **Dedicatória**

Aos meus Pais, que desde “os *baby steps*” até este “passo gigante”, estão sempre ao meu lado

## **Agradecimentos**

Aos meus Pais, que tornaram possível todo o meu percurso académico, com o seu apoio, carinho e amor.

À Professora Doutora Maria Odete Afonso, UEI Parasitologia Médica, GHTM, IHM/UNL, que ultrapassou todos os limites que se espera de uma Orientadora. A sua dedicação e valiosos conhecimentos foram os pilares para a realização deste trabalho, e para o meu “crescimento” profissional e pessoal. Ficarei eternamente grata pelo seu apoio científico e emocional, sem esquecer os bons momentos que passamos juntas. O meu respeito, admiração e carinho são infinitos.

Ao Investigador Doutor Maurício Luíz Vilela, Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, meu Coorientador, que me deu a oportunidade de conhecer os flebotomíneos do Novo Mundo. A sua colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho, sem a qual seria impossível. Recebeu-me, no Brasil, “de braços abertos” e transmitiu-me tudo o que sei sobre flebotomíneos do Novo Mundo. O seu “jeito carioca” é inesquecível.

À Investigadora Doutora Daniela Pita-Pereira, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endémicas do IOC/FIOCRUZ, Brasil, que, mesmo sem me conhecer no início do trabalho, aceitou fazer parte deste projeto. Graças ao seu apoio, colaboração, ajuda e ensinamentos, toda a parte molecular, referente aos flebotomos do Velho e do Novo Mundo, pôde ser realizada no mesmo laboratório seguindo a mesma metodologia.

À Professora Doutora Lenea Campino, Presidente do Conselho Científico do IHMT, UNL, UEI Parasitologia Médica, GHTM, IHM/UNL, por todos os seus vastos conhecimentos e artigos científicos publicados nesta área temática, dos quais muito aprendi. Também aos seus Colaboradores, Professora Doutora Carla Maia, Investigadora Doutora Sofia Cortes, Mestre José Manuel Cristóvão e Doutorando André Pereira, os meus agradecimentos pela ajuda quando me surgiram “dúvidas inesperadas”.

Ao Professor Doutor António Paulo Gouveia de Almeida, UEI Parasitologia Médica, GHTM, IHM/UNL, que aceitou fazer parte da Comissão Tutorial deste Doutoramento e foi o suporte para análise estatística, deste trabalho. Por todo o apoio e sábias palavras, muito obrigada.

Ao Professor Doutor Reginaldo Peçanha Brazil, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, que aceitou ser Membro da Comissão Tutorial da Tese de Doutorado e que, mesmo do “lado de lá”, sempre me transmitiu os seus conhecimentos e palavras de apoio.

Ao Professor Doutor João Pinto, atual Coordenador do Curso de Doutorado em Ciências Biomédicas, UEI Parasitologia Médica, GHTM, IHM/UNL, os meus agradecimentos, assim como ao Professor Doutor Henrique Silveira, UEI Parasitologia Médica, GHTM, IHM/UNL.

A todos os Membros da Divisão Académica e da Informática do IHMT, os meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade sempre constante e ajuda nas horas difíceis.

À Professora Doutora Manuela Vilhena, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Portugal, pelo suporte logístico, nomeadamente a disponibilidade da sua casa em Évora, fundamental como ponto de apoio para a realização de capturas flebotómicas no Distrito de Évora. Muito obrigada.

À Investigadora Doutora Elizabete Ferreira Rangel, Diretora do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, pelos conhecimentos transmitidos sobre a Ecoepidemiologia das Leishmanioses no Novo Mundo, aquando da realização do Curso que tive a oportunidade de efetuar na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

À Colega Joana Ferrolho e Familiares, pelo apoio científico e logístico, assim como pelas amáveis palavras que sempre tiveram para comigo.

Aos Presidentes de Juntas de Freguesia, e Colaboradores, dos Distritos de Évora e Beja, que me ajudaram na apresentação aos Proprietários de terrenos, habitações e quintas, e que sem a sua ajuda tudo teria sido mais difícil.

A todos os Proprietários de habitações, quintas, herdades e hotéis, que permitiram colocar armadilhas luminosas, nos seus terrenos, para captura de flebotómios.

À Doutora Janaína da Soledad Rodrigues, Coordenadora do Serviço de Vigilância Ambiental, Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda, Universidade de Barra Mansa, Brasil, por toda a sua imprescindível colaboração.

Ao Técnico de Meio Ambiente, Vigilância Ambiental, Sr. Silmar Ferreira Gomes, do Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda, Brasil, cuja colaboração e ajuda permitiram a captura flebotómica em Volta Redonda.

À Doutora Bruna de Azevedo Baêta, Médica Veterinária, Vigilância Ambiental, Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda, Universidade Severino Sombra, Brasil, por toda a colaboração e disponibilidade.

Às empresas SOLTRAFEGO e PLEXUS, Portugal, pelo apoio financeiro prestado.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Mira, Diretora do Departamento de Formação Avançada, Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), e a todos os meus Colegas da FCT, em particular à Marta, Raquel e Soraia, que muitas vezes “seguraram as pontas” para que eu conseguisse dedicar-me ao Doutorado.

Ao Técnico João Correia, meu Amigo, por todo o suporte gráfico e auxílio prestado sempre que a ele recorri, e à Técnica Heloísa Diniz, Laboratório de Produção e Tratamento de Imagens, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, pela elaboração do mapa do Município de Volta Redonda.

Ao João, por me dar todo o apoio quando a tarefa parecia “quase impossível”. Muito e muito obrigada pela compreensão, por ouvires os meus desabafos nas horas de desespero e pelos (muitos!) quilómetros na estrada quando “desaparecia” para capturar flebótomos.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal e Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, Instituições de acolhimento, sem as quais, o meu “sonho e realidade” não teriam sido possíveis.

FCT for funds to GHTM – UID/Multi/04413/2013.

## Resumo

Portugal, Velho Mundo, e Brasil, Novo Mundo, são países endémicos de Leishmaniose humana e canina, transmitida por flebotomíneos vetores, sendo o agente patogénico, desta zoonose, o protozoário *Leishmania infantum*, e o cão o principal reservatório.

Em Portugal, as espécies flebotomínicas comprovadamente vetoras de *L. infantum* são *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi*. Contudo, existem várias regiões que ainda não foram estudadas em termos entomológicos, ou não foram monitorizadas há mais de uma década, como é o caso do Alentejo. Já no que diz respeito ao Brasil, no Município de Volta Redonda, casos autóctones de Leishmaniose, humana e canina, foram somente reportados, pela primeira vez, em 2014, e nunca tinham sido realizadas prospeções flebotomínicas.

Com este trabalho, pretendeu-se determinar aspetos bioecológicos e vectoriais, quer no Alentejo, quer em Volta Redonda, tendo como objetivo contribuir para o esclarecimento da ocorrência de espécies vetoras de Leishmaniose nas referidas regiões do Velho e Novo Mundo.

Em ambos os países, determinaram-se: a abundância relativa das espécies capturadas por armadilha CDC, a razão dos sexos, as densidades, a variação sazonal, as infeções naturais das fêmeas por *Leishmania* sp., e as refeições sanguíneas das fêmeas ingurgitadas, por técnicas moleculares.

Em 2016/2017 (14 meses), nos Distritos de Évora e Beja, capturaram-se 431 exemplares, correspondentes às cinco espécies assinaladas em Portugal. A abundância relativa foi (ordem decrescente): 47,80% *P. perniciosus*, 35,96% *Sergentomyia minuta*, 12,76% *P. sergenti*, 2,55% *P. ariasi*, e 0,93% *P. papatasi*. *P. perniciosus* foi capturado em todas as localidades positivas para a presença de flebotomíneos, sendo a espécie com maior distribuição geográfica. A densidade total mais elevada foi 6,78, em julho. Em Volta Redonda as capturas realizaram-se entre outubro de 2016 e abril de 2018, (18 meses). Dos 165 exemplares capturados, por ordem decrescente de abundância, foram assinaladas as espécies: 86,06% *Lutzomyia longipalpis*, 10,91% *Evandromyia sallesi*, 2,42% *Nyssomyia whitmani*, e 0,60% *Ev. lenti*. A densidade total mais elevada foi 5,72, em abril.

Pela primeira vez, no Alentejo, foram assinaladas espécies naturalmente infetadas por *L. infantum*: uma *P. perniciosus* e quatro *S. minuta*. A ocorrência de *S. minuta* infetada por esta espécie de *Leishmania* foi, com este trabalho, assinalada pela primeira vez na Europa. Verificou-se que *P. perniciosus* e *S. minuta* se alimentaram em seres humanos, também igualmente demonstrado, pela primeira, vez nesta região.

Relativamente aos exemplares capturados em Volta Redonda, Brasil, uma *Lu. longipalpis* e duas *Ev. sallesi* foram capturadas naturalmente infetadas por *L. infantum*. Este facto é de especial interesse, uma vez que *Lu. longipalpis* é o principal vetor de Leishmaniose visceral no Novo Mundo.

Ainda que vários aspetos de risco e vetoriais tenham sido observados, pela primeira vez, nas duas regiões dos dois países, a monitorização flebotómica deverá ser continuada, não só devido às alterações climáticas e ambientais, que cada vez mais se manifestam, mas também para que medidas de controlo possam ser implementadas de forma eficaz ao conhecer-se, em *tempo real*, os parâmetros vetoriais, os reservatórios locais e a doença, humana e canina.

**Palavras-chave:** Flebotómíneos, infeção-*Leishmania infantum*, refeições sanguíneas, Alentejo-Portugal, Volta Redonda-Brasil.

## Abstract

Portugal-Old World and Brazil-New World are endemics countries for human and canine Leishmaniosis, transmitted by phlebotomine sand flies. The pathogenic agent of this zoonosis is the protozoa *Leishmania infantum*, and dog the main reservoir.

The proven vectors of *L. infantum* are *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* in Portugal. However, several areas have not been entomologically studied, or haven't been monitored for more than a decade, such as Alentejo region. Concerning Brazil, in Volta Redonda Municipality, autochthonous human and canine cases were only reported for the first time in 2014, and there had never been phlebotomine surveys.

With this work, it was intended to determine biological and vectorial aspects, both in Alentejo and Volta Redonda, with the goal of contributing for the clarification, of the occurrence of vector species of Leishmaniosis, in said regions of the Old and New World.

In both countries, it was determined the following entomological parameters: the relative abundance of the captured species by CDC light trap, sex ratio, densities, seasonal variation, natural infection of the females by *Leishmania* sp. and blood meals (by molecular techniques).

In 2016/2017 (14 months), in Évora and Beja Districts, 431 specimens were captured, corresponding to the five species reported in Portugal. The relative abundance was (in descending order): 47,80% *P. perniciosus*, 35,96% *Sergentomyia minuta*, 12,76% *P. sergenti*, 2,55% *P. ariasi*, and 0,93% *P. papatasi*. *P. perniciosus* was captured in all positive localities for sand fly presence and the species with the highest geographical distribution. The highest density was 6,78, in july. In Volta Redonda captures were performed from october 2016 until april 2018 (18 months). From 165 specimens captured, the following species were pointed out (in descending order): 86,06% *Lutzomyia longipalpis*, 10,91% *Evandromyia sallesi*, 2,42% *Nyssomyia whitmani*, and 0,60% *Ev. lenti*. The highest density was 5,72, in april.

For the first time in Alentejo, naturally infected species by *L. infantum* were found: one *P. perniciosus* and four *S. minuta*. With this study, the occurrence of infected *S. minuta* by *L. infantum* was recorded for the first time in Europe. It was also verified that *P. perniciosus* and *S. minuta* fed on humans, also equally demonstrated for the first time in this region.

In what concerns to the sand fly species in Volta Redonda, Brazil, one *Lu. longipalpis* and two *Ev. sallesi*, were captured being naturally infected by *L. infantum*. This is an especially interesting fact, given that *Lu. longipalpis* is the main vector of visceral Leishmaniosis in the New World.

Even though, several risk and vectorial aspects were observed and reported for the first time in the two regions of both countries, the phlebotomine monitoring should continue, not only due to climate and environmental changes, which manifest evermore frequently nowadays, but also so that control measures may be implemented efficiently by knowing, in *real time*, the vectorial parameters, reservoirs locations and the disease itself (human and canine).

**Key-words:** Phlebotomine sand flies, *Leishmania infantum* infection, blood meals, Alentejo-Portugal, Volta Redonda-Brazil.

## Índice geral

Artigos publicados e comunicações em congressos nacionais e internacionais.....	III
Dedicatória.....	VI
Agradecimentos .....	VII
Resumo.....	X
Abstract.....	XII
Índice de figuras.....	XVIII
Índice de quadros .....	XXVI
Lista de siglas e abreviaturas.....	XXVIII
1 Introdução .....	1
1.1 Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae): aspetos históricos e posição sistemática .....	1
1.2 Distribuição geográfica dos flebotomíneos.....	3
1.3 Importância Médica e Veterinária dos flebotomos como agentes de Harara e vetores de <i>Leishmania</i> spp., <i>Bartonella</i> sp., e arbovírus .....	4
1.4 Espécies flebotomínicas comprovadamente vetoras de <i>Leishmania</i> spp. no Velho e Novo Mundo: critérios de incriminação .....	8
1.5 Principais características morfológicas dos flebotomíneos: adultos e imaturos .....	14
1.6 Ciclo de vida e aspetos bioecológicos de flebotomíneos: Velho e Novo Mundo .....	17
1.7 Espécies flebotomínicas conhecidas em Portugal: aspetos históricos, bioecológicos e vetoriais.....	21
1.8 Espécies flebotomínicas conhecidas no Brasil: aspetos históricos, bioecológicos e vetoriais.....	25
1.9 Desenvolvimento intravetorial de <i>Leishmania</i> spp. ....	30
1.9.1 Mecanismo e tipo de transmissão.....	35
1.10 Leishmanioses no Velho e no Novo Mundo: Portugal e Brasil .....	36
1.11 Influência das alterações climáticas e ambientais nos vetores, e na epidemiologia das leishmanioses .....	43
1.12 Controlo dos vetores na luta integrada contra as leishmanioses .....	48
1.12.1 Importância da monitorização vetorial em áreas endémicas e/ou em risco .....	52
1.13 Objetivo geral.....	54
1.13.1 Objetivos específicos .....	54
2 Material e Métodos .....	56
2.1 Caracterização das áreas de estudo: Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, e Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	56

2.1.1	Demografia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	58
2.1.2	Hidrologia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	60
2.1.3	Geologia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	61
2.1.4	Clima - temperatura, precipitação, humidade relativa e ventos dominantes: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	62
2.1.5	Coberto vegetal: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	62
2.1.6	Fauna: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	63
2.2	Capturas flebotómicas nos Distritos de Beja e Évora, Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil: concelhos, freguesias e localidades prospetadas .....	64
2.2.1	Consentimento dos proprietários para a realização de capturas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	65
2.2.2	Caracterização do tipo e variedades de biótopos prospetados das áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	66
2.2.3	Períodos de prospeção, determinação das coordenadas, temperatura, humidade relativa e velocidade do vento, e fichas de campo: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	67
2.2.4	Método de captura e conservação dos exemplares capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	68
2.3	Identificação morfológica das espécies flebotómicas capturadas no Alentejo, Portugal, e em Volta Redonda, Brasil.....	70
2.3.1	Metodologia aplicada para identificação das fêmeas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	71
2.3.2	Preparação das fêmeas, Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil, após identificação morfológica, para posterior análise molecular.....	76
2.3.3	Metodologia aplicada para identificação dos machos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	77
2.4	Parâmetros bioecológicos e vetoriais determinados a partir de espécimes capturados no Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	82
2.4.1	Número de espécies flebotómicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	82
2.4.2	Abundância relativa de espécies flebotómicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	83
2.4.3	Densidade flebotómica por espécie e por mês, variação sazonal, e mês (ou meses) de maior risco de transmissão nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	83
2.4.4	Densidade flebotómica total e por espécie, por tipo e variedade de biótopos nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	83
2.4.5	Razão dos sexos dos flebotómicos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	83

2.4.6	Proporção de fêmeas ingurgitadas e grávidas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	84
2.4.7	Grau de rotação da genitália dos machos, total e por espécie, capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	84
2.4.8	Taxa de infestação de flebotomíneos, por ectoparasitas, capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	84
2.4.9	Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	84
2.4.10	Taxa de infeção por <i>Leishmania</i> sp. das espécies flebotomínicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	85
2.4.11	Proporção das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotomínicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	85
2.5	Análise molecular das fêmeas flebotomínicas capturadas nos dois países: deteção de DNA de <i>Leishmania</i> sp. e determinação das refeições sanguíneas.....	85
2.5.1	Lise e extração de DNA a partir de flebotomíneos .....	85
2.5.2	Deteção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos pela amplificação da região conservada do minicírculo de kDNA em <i>Leishmania</i> spp. e gene <i>cacophony</i> em flebotomíneos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil .....	86
2.5.3	Determinação das refeições sanguíneas pela amplificação de um segmento do <i>citocromo b</i> de exemplares capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	87
2.5.4	Verificação dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose e hibridização por Dot blot .....	87
2.5.5	Sequenciação dos segmentos de DNA.....	89
2.6	Análise de dados: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil.....	89
3	Resultados .....	90
3.1	Número de exemplares capturados no Alentejo, Portugal, em 2016 e 2017, e espécies flebotomínicas identificadas morfológicamente .....	90
3.2	Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas no Alentejo, 2016 e 2017.....	90
3.2.1	Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas, por Distrito, no Alentejo, 2016 e 2017 .....	93
3.3	Concelhos, freguesias, localidades, tipos e variedades de biótopos prospetados, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, 2016 e 2017 .....	93
3.4	Fêmeas flebotomínicas capturadas, por armadilha CDC, grávidas ou ingurgitadas, nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017.....	97
3.5	Grau da rotação da genitália externa dos flebotomíneos machos, capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017 .....	101

3.6	Razão dos sexos, por espécie flebotomínica, dos exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017.....	102
3.7	Infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não <i>Leishmania</i> sp.....	102
3.8	Densidade flebotomínica, variação sazonal das espécies, e tipos e variedades de biótopos prospectados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, 2016 e 2017.....	103
3.8.1	Densidade flebotomínica por biótopo, doméstico e peridoméstico, das espécies capturadas em 2016 e 2017, Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal.....	107
3.9	Infeção flebotomínica por <i>Leishmania infantum</i> , em exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017.....	113
3.10	Refeições sanguíneas das espécies flebotomínicas capturadas ingurgitadas, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017.....	115
3.11	Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas totais, de exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017.....	117
3.12	Número de exemplares capturados no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em 2016, 2017 e 2018, e espécies flebotomínicas identificadas morfológicamente.....	117
3.13	Abundância relativa das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas em Volta Redonda, Brasil, nos três anos de capturas, 2016, 2017 e 2018.....	118
3.13.1	Abundância relativa das espécies flebotomínicas, capturadas em Volta Redonda, Brasil, por ano de captura, 2016, 2017 e 2018.....	120
3.14	Localidades, bairros, tipos e variedades de biótopos prospectados em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....	121
3.15	Fêmeas flebotomínicas capturadas, por armadilha CDC, grávidas ou ingurgitadas, em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....	123
3.16	Razão dos sexos, por espécie flebotomínica, dos exemplares capturados em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....	124
3.17	Infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não <i>Leishmania</i> sp.....	124
3.18	Densidade flebotomínica das espécies capturadas nos meses comuns, dos anos 2016, 2017 e 2018, Volta Redonda, Brasil.....	124
3.19	Infeção flebotomínica por <i>Leishmania infantum</i> , em exemplares capturados no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....	127
4	Discussão e Conclusões.....	129
5	Referências bibliográficas.....	138
6	Anexos.....	156

## Índice de figuras

Fig. 1 - Mapa em que estão mencionados géneros de flebotomos do Velho e do Novo Mundo. À esquerda e à direita, encontram-se também os géneros flebotomínicos, existentes nas referidas regiões, de acordo com a classificação de Galati (2003; 2013) (Adaptado de Depaquit & Léger, 2017).....	4
Fig. 2 - Biótopo correspondente a uma zona árida e quente do Irão, onde existem vários abrigos para pequenos roedores que atuam como reservatórios favorecendo o ciclo zoonótico de leishmaniose cutânea (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2017).....	5
Fig. 3 - Flebotomíneos de ambos os sexos (em etanol e capturados no Alentejo, Portugal, 2017) Fotografia de S. Pereira.....	14
Fig. 4 - Aspetto geral da cabeça de um flebotomíneo (Adaptado de <a href="https://zenodo.org/record/277086#.WwGhX-4vzIU">https://zenodo.org/record/277086#.WwGhX-4vzIU</a> ) (Acedido a 9 de julho de 2018).....	15
Fig. 5 - Esquema da asa de um flebotomíneo. Observa-se a segunda nervura costal bifurcada duas vezes (setas vermelhas). (Adaptado de Andrade Filho <i>et al.</i> , 2004).....	15
Fig. 6 - Extremidade posterior do abdómen de um flebotomo macho e principais estruturas da genitália externa (Adaptado de Lane, 1993).....	16
Fig. 7 - Extremidade posterior do abdómen de um flebotomo fêmea e principais estruturas da genitália externa e interna (Adaptado de Lane, 1993).....	16
Fig. 8 - Larvas de flebotomíneos, do primeiro (L1) ao último estado (L4) (Adaptado de <a href="http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html">http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html</a> )....	17
Fig. 9 - Pupa de flebotomíneo (Adaptado de Halada, <i>et al.</i> , 2018).....	17
Fig. 10 - Ciclo de vida dos flebotomos: ovos, larvas, pupa, adultos, e duração aproximada de um estado a outro (Adaptado de Afonso & Alves-Pires, 2008; <a href="http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm">http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm</a> ) (Acedido a 9 de julho de 2018).....	19
Fig. 11 - Biótipos utilizados por flebotomíneos para repouso (adultos), postura (fêmeas), e desenvolvimento larvar e pupal: <b>A</b> - Buracos em muros, Marrocos; <b>B</b> -Termiteiras, onde se pode encontrar <i>Phlebotomus martini</i> , junto a habitações humanas (ex. Sudão, Etiópia, Uganda e Quénia) (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2017).....	21
Fig. 12 - Número total (N) e Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas em distritos de Portugal, estando numerados, de 1 a 10, os estudos mais recentemente realizados: 1 - Afonso <i>et al.</i> , 2007b; 2- Vilela <i>et al.</i> , 2016; 3- Branco, 2011; 4- Alves Pires <i>et al.</i> , 2004; 5- Maia <i>et al.</i> , 2010a; 6- Alves-Pires <i>et al.</i> , 2008; 7- Maia <i>et al.</i> , 2015; 8- Miguel, 2016; 9- Gouveia, 2016; 10- Pereira <i>et al.</i> , 2008.....	25

- Fig. 13 - Distribuição, conhecida, das principais espécies flebotomínicas, vetoras da leishmaniose cutânea, no Brasil, por Estado. Manual da Secretaria de Vigilância da Saúde - Ministério da Saúde, 2010. Adaptado por M. Vilela. 1- Acre; 2- Amazonas; 3- Roraima; 4- Pará; 5- Amapá; 6- Maranhão; 7- Piauí; 8- Ceará; 9- Rio Grande do Norte; 10- Paraíba; 11- Pernambuco; 12- Alagoas; 13-Sergipe; 14- Baía; 15- Minas Gerais; 16- Espírito Santo; 17- Rio de Janeiro; 18- São Paulo; 19-Paraná; 20- Sta. Catarina; 21- Rio Grande do Sul; 22- Mato Grosso do Sul; 23- Goiana; 24-Tocantins; 25- Mato Grosso; 26- Rondônia.....27
- Fig.14 - Distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* em diferentes Estados do Brasil. 1- Acre; 2- Amazonas; 3- Roraima; 4- Pará; 5- Amapá; 6- Maranhão; 7- Piauí; 8- Ceará; 9- Rio Grande do Norte; 10- Paraíba; 11- Pernambuco; 12- Alagoas; 13- Sergipe; 14- Baía; 15- Minas Gerais; 16- Espírito Santo; 17- Rio de Janeiro; 18- São Paulo; 19- Paraná; 20- Sta. Catarina; 21- Rio Grande do Sul; 22- Mato Grosso do Sul; 23- Goiana; 24- Tocantins; 25- Mato Grosso; 26- Rondônia.....28
- Fig. 15 - No Brasil, a raposa da espécie *Lycalopex veulus* é um reservatório de *L. infantum*. As setas indicam os locais de maior probabilidade de picada por flebotomíneos (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017).....28
- Fig. 16 - Introdução humana em biótopo silvestre, motivadora da adaptação de algumas espécies flebotomínicas a ambientes humanos, Guatemala (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017).....29
- Fig. 17 - Ciclos de transmissão, flebotomíneos vetores, reservatórios e hospedeiro acidental, do protozoário *Leishmania* spp. Adaptado de: <http://blogs.diariodonordeste.com.br/bemestarp/geral/ciclo-de-palestras-debate-liberacao-do-tratamento-da-leishmaniose-visceral-canina/> (Acedido a 6 de agosto de 2018).....31
- Fig.18 - Aumento da probabilidade de transmissão de *Leishmania* na sequência de uma segunda refeição sanguínea, não infetada, de uma espécie flebotomínica vatora, antes da existência de formas metacíclicas. As setas circulares, a negro, indicam a multiplicação de leptomonas e de retroleptomonas. Os círculos azuis indicam o aumento das formas haptomonas nos três eventuais cenários (Adaptado de Serafim *et al.*, 2018).....34
- Fig. 19 **A** - Na Índia, biótopo rico em matéria orgânica, junto das habitações humanas, propício à transmissão de leishmaniose; **B** - No Sudão, biótopo onde é propício o desenvolvimento do ciclo antroponótico de leishmaniose (Adaptado de Alvar, 2018).....35
- Fig. 20 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela manifestação de leishmaniose cutânea nos diferentes Estados do Brasil (Fonte: Manual da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasil).....39
- Fig. 21 **A**- mapa da Europa com a distribuição atual de *P. perniciosus* (a verde escuro), potencial distribuição modelada (a verde claro), potencial distribuição preditiva para o período de 2011-2040 (a laranja), e potencial distribuição preditiva para o período 2041-2070 (a amarelo); **B**- legenda idêntica, mas para a espécie *P. ariasi* (Adaptado de Trájer *et al.*, 2013).....45

Fig. 22 - Mapa do Brasil onde estão assinaladas as regiões propícias à espécie <i>Ny. intermedia</i> , nos anos 2041-2060 (Adaptado de Rangel <i>et al.</i> , 2018).....	46
Fig. 23 - Irão, biótopo modificado por catástrofe natural (terramoto), formando abrigos naturais favoráveis ao desenvolvimento flebotomínico e recrudescência de leishmaniose cutânea. O círculo reforça a imagem no que diz respeito à habitação humana destruída, com buracos, matéria orgânica em volta e pessoas nas imediações (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2017).....	48
Fig. 24 - Envolvimento das comunidades locais de áreas endémicas de leishmaniose. Educação sanitária transmitida por trabalhadores qualificados e cartazes explicativos: fundamentais para que a mensagem sobre a doença e os vetores possa ser atingida. <b>A</b> - Índia; <b>B</b> - Bolívia; <b>C</b> – Bangladesh (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2017).....	50
Fig. 25 - Irão, contribuição para o controlo da leishmaniose através do envenenamento de roedores, reservatórios do parasita. Os produtos tóxicos são colocados nas tocas (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2018).....	51
Fig. 26 <b>A</b> - Parque numa zona urbana de Madrid, Espanha, em que surgiram mais de 600 casos de leishmaniose visceral; <b>B</b> – Lebres, reservatórios de <i>L. infantum</i> , juntamente com os cães existente na área (Adaptado de Alvar <i>et al.</i> , 2018).....	53
Fig. 27 - Mapa de Portugal continental em que estão assinalados os Distritos de Évora e Beja e os respetivos concelhos.....	57
Fig. 28 - Mapa do Brasil com a localização do Estado do Rio de Janeiro e do Município de Volta Redonda (Adaptado de <a href="https://pt.wikipedia.org/wiki/Volta_Redonda">https://pt.wikipedia.org/wiki/Volta_Redonda</a> acedido a 11 de julho de 2018).....	58
Fig. 29 - Número de habitantes dos 14 concelhos do Distrito de Évora, em 2015. (Adaptado de INE, 2015).....	59
Fig. 30 - Número de habitantes dos 14 concelhos do Distrito de Beja, em 2015. (Adaptado de INE, 2015).....	59
Fig. 31 - Evolução demográfica do Município de Volta Redonda, desde 1940 a 2010. (Adaptado de IBGE, 2017).....	60
Fig. 32 - Geomorfologia do Município de Volta Redonda (Adaptado de Dias <i>et al.</i> , 2005).....	61
Fig. 33 - Tipos e variedades de biótopos prospetados: <b>A</b> - biótopo peridoméstico, variedade curral veados, <b>B</b> - biótopo peridoméstico, variedade capoeira, <b>C</b> - biótopo doméstico, variedade muro junto a habitação humana, <b>D</b> - biótopo doméstico, variedade armazém, contíguo a habitação humana. Assinalado a vermelho: tipo e variedade de biótopo; assinalado a azul: armadilha luminosa miniaturizada, tipo CDC (Fotografia - S. Pereira, Alentejo, 2016 e 2017).....	66
Fig. 34 <b>A</b> - Registo de dados, após a colocação de uma armadilha luminosa. <b>B</b> - Caderno de campo com as respetivas fichas, e duas armadilhas e uma gaiola (Fotografia: S. Pereira, 2017, Alentejo).....	67

Fig. 35 - Aspetto geral da armadilha luminosa CDC (Fotografia S. Pereira, 2017, Alentejo).....	68
Fig. 36 <b>A</b> - Aspirador elétrico, gaiola de retenção de flebotomíneos, e tubos de plástico com etanol 90%; <b>B</b> - Tubos de plástico, já na bancada do Laboratório, para serem separados os flebotomíneos, de outros eventuais insetos (Fotografia S. Pereira, 2016, Alentejo).....	69
Fig. 37 - Armadilha utilizada para capturas no Município de Volta (Fotografia M. Vilela, 2017, Volta Redonda).....	70
Fig. 38 - Placa de Petri com flebotomíneos, de ambos os sexos, para serem separados e colocados em diferentes tubos, devidamente etiquetados (Fotografia S. Pereira, 2017, Alentejo).....	71
Fig. 39 - Microscópio ótico para identificação morfológica das espécies flebotomínicas fêmeas e folha com a representação esquemática das diferentes espermatecas (Fotografia S. Pereira, 2017).....	72
Fig. 40 - Esquema de espermateca de <i>Sergentomyia minuta</i> . Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011).....	73
Fig. 41 - Esquema de espermateca de <i>Phlebotomus sergenti</i> . Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011).....	73
Fig. 42 - Esquema de espermateca de <i>Phlebotomus perniciosus</i> . Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011).....	74
Fig. 43- Esquema de espermateca de <i>P. papatasi</i> . Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011).....	74
Fig. 44 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> fêmea. Esquema das características morfológicas do cibário (Adaptado de Shaimabuku <i>et al.</i> , 2011).....	75
Fig. 45 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> fêmea. Esquema das características morfológicas da espermateca (Adaptado de Shaimabuku <i>et al.</i> , 2011).....	75
Fig. 46 - <i>Evandromyia sallesi</i> fêmea. Esquema das características morfológicas do cibário (Adaptado de Shaimabuku <i>et al.</i> , 2011).....	76
Fig. 47 - <i>Evandromyia sallesi</i> fêmea. Esquema das características morfológicas das espermatecas (Adaptado de Shaimabuku <i>et al.</i> , 2011).....	76
Fig. 48 - Identificação morfológica de flebotomíneos machos, ao estereomicroscópio (Fotografia S. Pereira, 2016).....	78
Fig. 49 - <i>Phlebotomus sergenti</i> macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres <i>et al.</i> , 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o lobo basal pedunculado, característico desta espécie.....	78

- Fig. 50 - *Phlebotomus papatasi* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o gonóstilo delgado e comprido com espinhas curtas, características desta espécie.....79
- Fig. 51- *Sergentomyia minuta* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o gonóstilo com 4 espinhas apicais fortes e uma seda não caduca, características desta espécie.....79
- Fig. 52 - *Phlebotomus ariasi* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o edeago, ou pénis, em forma de clava, com dilatação subapical moderada, características desta espécie.....80
- Fig. 53 - *Phlebotomus perniciosus* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o edeago, ou pénis, afilado e bífido no ápex, características desta espécie .....80
- Fig. 54 **A** - Esquema da cabeça de *Lutzomyia longipalpis*. **B** - genitália externa de um macho (Adaptado de Young, 1979).....81
- Fig. 55 - Esquema da genitália externa de *Evandromyia (Barrettomyia) sallesi* macho (Adaptado de Young, 1979).....81
- Fig. 56 **A** - Esquema da extremidade distal dos canais, ou espículos ejaculadores, bifurcada; **B**- genitália de *Nyssomyia whitmani* macho (Adaptado de Young, 1979).....82
- Fig. 57 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas, de maio a novembro de 2016 e 2017, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal e fotografias, ao microscópio ótico, das espermatecas e das genitálias externas das espécies *Phlebotomus perniciosus* (PN), *P. ariasi* (PA), *P. sergenti* (PS), *P. papatasi* (PP) e *Sergentomyia minuta* (SM).....91
- Figura 58 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas, de maio a novembro, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, em 2016 (**A**) e em 2017 (**B**).....91
- Fig. 59 - Abundância relativa das espécies flebotomínicas, capturadas em 2016 e 2017 nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, para fêmeas (**A**) e para machos (**B**).....92
- Fig. 60 - Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas nos Distritos de Évora (**A**) e Beja (**B**), em 2016 e 2017.....93
- Fig. 61 - Concelhos prospetados, positivos e negativos para a presença de flebotomíneos, nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017.....94

Fig. 62 - Localidades prospetadas, e numeradas, por concelho, no Distrito de Évora, 2016 e 2017.....	94
Fig. 63 - Localidades prospetadas, e numeradas, por concelho, no Distrito de Beja, 2016 e 2017.....	95
Fig. 64 - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade (número), no Distrito de Évora, 2016 e 2017. Assinalado, com um círculo, o concelho do Alandroal: capturadas as cinco espécies flebotomínicas.....	96
Fig. 65 - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade (número), no Distrito de Beja, 2016 e 2017.....	96
Fig. 66 <b>A</b> - Biótopo peridoméstico, variedade muro, onde foi capturada uma fêmea <i>P. perniciosus</i> grávida, 2016, Évora. Assinalada, com uma seta, uma armadilha CDC; <b>B</b> - Biótopo doméstico, variedade armazém, onde foram capturadas três fêmeas grávidas <i>P. perniciosus</i> , 2017, Beja (Fotografias S. Pereira, 2016, 2017).....	98
Fig. 67 - Dois aspetos da variedade de biótopo onde foi capturada uma fêmea <i>P. papatasi</i> ingurgitada. <b>A</b> - Curral de veados; <b>B</b> - Palha para mesmos (Fotografia S. Pereira, 2017).....	100
Fig. 68 <b>A</b> - <i>P. papatasi</i> macho com a genitália externa com rotação completa; <b>B</b> - <i>P. ariasi</i> macho, com a genitália externa não rodada (observação ao estereomicroscópio) (Fotografia S. Pereira, 2017).....	101
Fig. 69 - Exemplar macho de <i>Phlebotomus sergenti</i> com um ácaro na genitália externa, assinalado por uma seta preta (Fotografia A. Pereira, 2016).....	102
Fig. 70 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura, comuns nos anos de 2016 e 2017. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média no Distrito de Évora e Beja (PN - <i>P. perniciosus</i> ; PS - <i>P. sergenti</i> ; PA - <i>P. ariasi</i> ; PP - <i>P. papatasi</i> ; SM - <i>S. minuta</i> ).....	104
Fig. 71 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura em 2016, nos Distritos de Évora e Beja. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média (PN - <i>P. perniciosus</i> ; PS - <i>P. sergenti</i> ; PA - <i>P. ariasi</i> ; PP - <i>P. papatasi</i> ; SM - <i>S. minuta</i> ; ; D - Densidade .....	105
Fig. 72 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura, em 2017, nos Distritos de Évora e Beja. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média (PN - <i>P. perniciosus</i> ; PS - <i>P. sergenti</i> ; PA - <i>P. ariasi</i> ; PP- <i>P. papatasi</i> ; SM - <i>S. minuta</i> ; D - Densidade).....	106
Fig. 73 - Densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos domésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal.....	107
Fig. 74 - Densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos peridomésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal.....	109

Fig. 75 - **11** - *S. minuta* positiva para *L. infantum*, infecção natural, Beja, 2016; C<sup>+</sup> - controle positivo, formado por DNA de *pool* de insetos e promastigotas de *L. infantum*. Dot Blot PCR multiplex, tendo como alvo o fragmento de 220 pb referente ao gene *cacophany* (flebotomos) e 120 pb a partir do kDNA (*Leishmania* spp.); **A** - gel de agarose (2%); **M** - marcador 100 pb; C<sup>-</sup> - Controle negativo da reação; **1 e 2** - DNA de flebotomíneos machos; **3 a 10** - DNA de fêmeas; **B** - Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*..... 114

Fig. 76 - **6, 7, 8 e 9** amostras de *S. minuta*, e **10** amostra de *P. perniciosus*, positivas para infecção natural por *L. infantum*: diagnóstico molecular por Dot Blot PCR multiplex, tendo como alvo o fragmento de 220 pb referente ao gene *cacophany* (flebotomos) e 120 pb a partir do kDNA (*Leishmania* spp.); **A** - gel de agarose (2%); **M** - marcador 100 pb; C<sup>-</sup> - Controle negativo da reação; **1 e 2** - DNA de machos; **3 a 19**- DNA de fêmeas; C<sup>+</sup> - Controle positivo formado por DNA de *pool* de insetos e promastigotas de *L. infantum*; **B** - Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*..... 114

Fig. 77 - Biótopos onde foram capturadas fêmeas naturalmente infetadas com *L. infantum*: **A** - biótopo peridoméstico, variedade armazém (Beja, 2017) **B** - biótopo doméstico, variedade armazém (neste biótopo, foram também capturadas três fêmeas grávidas - *P. perniciosus*) (Beja, 2017) (Fotografia S. Pereira, 2017)..... 115

Fig. 78 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas no Município de Volta Redonda, Brasil, nos três anos de capturas; 2016, 2017 e 2018. *Lu.* - *Lutzomyia*; *Ev.* – *Evandromyia*; *Ny.* – *Nyssomyia*. Fotografias dos cibários e espermatecas das referidas espécies (Fotografias de M. Vilela, 2017)..... 119

Fig. 79 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas no Município de Volta Redonda, Brasil, em 2016 - **A**, em 2017- **B** e em 2018 - **C**..... 122

Fig. 80 - Localidades prospectadas no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em **2016 (A)**, **2017 (B)**, **2018 (C)**, e no conjunto dos **três anos (D)**. Em quadrados verdes e azuis estão assinaladas as localidades onde se registaram casos de leishmaniose visceral humana e canina respetivamente. Os números entre parêntesis () correspondem ao número de CDC colocadas. Os círculos vermelhos e amarelos, correspondem, respetivamente, a capturas positivas e negativas para flebotomíneos..... 120

Fig. 81 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2016 e 2017, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e humidade relativa média..... 125

Fig. 82 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2017 e 2018, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e humidade relativa média..... 126

- Fig. 83 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, dos anos 2016, 2017 e 2018, e respectivos meses de captura no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e humidade relativa média.....127
- Fig. 84 - Biótopos peridomésticos prospectados no Município de Volta Redonda, Brasil, na localidade de Eucaliptal, onde foi capturada uma fêmea de *Lu. longipalpis* naturalmente infetada por *L. infantum*. **A** - armazém, **B** - galinheiro (Fotografia M. Vilela, 2016).....126
- Fig. 85 - Fêmeas flebotomínicas positivas, para *Leishmania* sp., por Dot Blot, PCR multiplex, através da amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* sp. (120 pb) e gene cacophony de flebotomíneos (220 pb). **A**: gel de agarose 2%, onde a coluna 8 corresponde à espécie *L. longipalpis* e as colunas 9 e 10 à espécie *Evandromyia sallesi*. M- Peso Molecular de 100 pb; C- Controlo negativo (sem DNA adicionado); colunas 1 e 2: Controlo negativo - flebotomíneos machos) e **B**: Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*. **8 a 10**: 1 Amostra de *L. longipalpis* (slot 8) e 2 amostras *Evandromyia sallesi* (slots 9 e 10) positiva para infecção por *L. infantum*. C+: controle positivo.....128

## Índice de quadros

Quadro 1 - Espécies flebotomínicas vetoradas, ou suspeitas, de leishmanioses no Velho Mundo, e as formas clínicas, comuns e raras, em humanos, das mesmas regiões.....	10
Quadro 2 - Espécies flebotomínicas vetoradas, ou suspeitas, de leishmanioses no Novo Mundo, e as formas clínicas, comuns e raras, em humanos das mesmas regiões.....	11
Quadro 3 - Géneros, subgéneros e espécies flebotomínicas assinalados em Portugal.....	21
Quadro 4 - Número de casos reportados de leishmaniose visceral humana nas cinco Regiões administrativas do Brasil, em 2014, salientando-se o maior número no Nordeste.....	40
Quadro 5 - Número de casos reportados de leishmaniose cutânea nas cinco Regiões Administrativas do Brasil, em 2016 (N/A- não assinalados).....	41
Quadro 6 - Número total de flebotomíneos, por espécie e por sexo, capturados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017.....	90
Quadro 7 - Concelhos, freguesias, coordenadas das localidades prospectadas e espécies flebotomínicas capturadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017.....	97
Quadro 8 - Fêmeas flebotomínicas capturadas ingurgitadas, por mês, ano, Distrito, localidade, tipo e variedade de biótopo. As cores assinalam as diferentes variedades de biótopos.....	100
Quadro 9 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2016 e 2017.....	104
Quadro 10 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2016.....	105
Quadro 11 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2017.....	107
Quadro 12 - Número de flebotomíneos capturados, número de CDC colocadas, densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos domésticos, prospectados em 2016 e 2017, Alentejo.....	108
Quadro 13 - Número de flebotomíneos capturados, número de CDC colocadas, e densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos peridomésticos, prospectados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal.....	110
Quadro 14 - Espécies flebotomínicas, naturalmente infetadas por <i>L. infantum</i> , capturadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017, por mês, concelho, freguesia, localidade, tipo e variedade de biótopo. As diferentes cores, por linha, assinalam as localidades onde as fêmeas foram capturadas infetadas.....	114

- Quadro 15 - Identificação da fonte das refeições sanguíneas das fêmeas flebotômicas capturadas ingurgitadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017. As cores, por linhas, assinalam o tipo de fonte alimentar.....116
- Quadro 16 - Número total de flebotômicos capturados por espécie, sexo, ano e mês, no Município de Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018.....118
- Quadro 17 - Localidades, bairros prospectados e coordenadas, em Volta Redonda, Brasil, e espécies flebotômicas capturadas em 2016, 2017 e 2018. Assinaladas, a vermelho e com um círculo azul, estão representadas as localidades e as espécies flebotômicas infetadas por *Leishmania infantum*.....123
- Quadro 18 - Densidade flebotômica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2016 e 2017, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e humidade relativa média.....125
- Quadro 19 - Densidade flebotômica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2017 e 2018 no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e humidade relativa média.....126

## Lista de siglas e abreviaturas

% - Percentagem

°C - Graus centígrados

CA- Califórnia

CDC - Centers for Diseases Control and Prevention

cm - Centímetro

cm<sup>2</sup> - Centímetros quadrados

Csa - Clima temperado húmido com verão seco e quente, segundo Classificação climática de Köppen-Geiger

cyt b – Citocromo b

Cwa - Clima temperado húmido com inverno seco e verão quente, segundo Classificação climática de Köppen-Geiger

D - Densidade flebotomínica

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DGS – Direção Geral da Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico (DNA), do inglês Deoxyribonucleic acid (DNA)

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês enzyme-linked immunosorbent assay

EUA - Estados Unidos da América

*Ev.* - Género *Evandromyia*

Ex. - Exemplo

Fig. - Figura

Figs. - Figuras

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

g - Grama

GPS - Sistema de posicionamento geográfico, do inglês Global Positioning System

h - Horas

H<sub>2</sub>O – Composição química da água

HCl – Ácido clorídrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INE - Instituto Nacional de Estatística

IPMA - Instituto Português do Mar e Atmosfera

Km - Quilómetro

Km<sup>2</sup> - Quilómetro (s) quadrados

KCl – Cloreto de potássio

kDNA - DNA do cinetoplasto, do inglês kinetoplast DNA

KW –Kruskall-Wallis

*L.* - *Leishmania*

LC - Leishmaniose cutânea

LCan - Leishmaniose canina

LCD - Leishmaniose cutânea disseminada ou difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LCPK - Leishmaniose cutânea pós kala-azar

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LIDEV - Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera, Instituto Oswaldo Cruz

LPG – Lipofosfoglicano

LR - Leishmaniose recidivante

LV - Leishmaniose visceral

*Lu.* - Género *Lutzomyia*

m - Metro (s)

min - Minuto (s)

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

*My.* - Género *Mygonemyia*

ml - Mililitro (s) =  $10^{-3}$  litro

mm - Milímetro (s) =  $10^{-3}$  metro

mM - Milimolar (s) =  $10^{-3}$  mol

Nº - Número

N - Norte

*Ny.* - Género *Nyssomyia*

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses

*P.* - Género *Phlebotomus*

PA - *Phlebotomus ariasi*

pb - pares de base, do inglês base pair

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase chain reaction

PN - *Phlebotomus perniciosus*

PP - *Phlebotomus papatasi*

PS - *Phlebotomus sergenti*

PSG - Gel secretório promastigota, do inglês secretor promastigote gel (SPG)

S - Sul

s - Segundo

SM - *Sergentomyia minuta*

sp. - Espécie

spp. - Espécies

ssp.- Subespécie

sspp. - Subespécies

TBE - Mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA

TE - Tris-EDTA buffer

$\mu$ L - Microlitro

UNL - Universidade Nova de Lisboa

UV - Ultravioleta

V - Volts

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

VS - *versus*

W - Oeste

x - Vezes

# 1 Introdução

## 1.1 Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae): aspetos históricos e posição sistemática

Os registos paleontológicos mais antigos relativos a flebotomíneos, mostram que estes existem, pelo menos, desde o Cretáceo Inferior, há cerca de 130 milhões de anos (Azar & Nel, 2003). Contudo, a primeira referência científica, no que diz respeito ao estudo destes insetos, surgiu em 1691, em Roma, com uma ilustração de Philipppo Bonanni. Mais tarde, em 1786, Giovaanni Scopoli descreveu a primeira espécie flebotomínica, que denominou *Bibio papatasi*, posteriormente alterada para *Phlebotomus papatasi*. As fêmeas flebotomínicas são reconhecidas como insetos hematófagos, sendo a sua designação proveniente do grego *fleb* + *tomo*, que significa “cortador de veias” (Dedet, 2005). Em relação à posição sistemática, os referidos insetos pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, superordem Exopterygota, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Maroli *et al.*, 2013).

Desde o início dos estudos taxonómicos dos flebotomíneos, e dos que têm vindo, presentemente, a ser realizados, não é consensual, entre os Investigadores, a classificação que deve ser adotada, mesmo a nível de género e subgénero (Akhoundi *et al.*, 2016).

Numa primeira fase, a classificação dos flebotomíneos, do Velho e do Novo Mundo, baseou-se nas características morfológicas externas das estruturas da genitália e das nervuras alares, o que levou a uma subdivisão destes insetos. Assim, em 1843, Rondani & Berté criaram o género *Phlebotomus* e propuseram a primeira divisão, utilizando como caracteres diferenciais as sedas que revestem o abdómen. Em 1914, os mesmos autores, sugeriram uma nova divisão, baseada nas características da genitália masculina, além das nervuras alares e da fórmula relativa aos palpos e antenas. Em 1919, o Investigador Português Carlos França, com base nas características morfológicas da genitália masculina, separou as espécies do Velho Mundo das do Novo Mundo e dividiu o género *Phlebotomus* nos subgéneros *Phlebotomus* s.str. e *Newsteadia*. Em 1921, conjuntamente com Parrot, os dois Investigadores, substituíram

*Newsteadia* por *Sergentomyia* e definiram os subgêneros *Brumptomyia*, *Prophlebotomus* e *Lutzomyia*, para o Novo Mundo (Afonso *et al.*, 2007a). Entre 1948 e 1958, Theodor passou a adotar a categoria de subfamília Phlebotominae, baseando-se, fundamentalmente, na armadura bucal, e elevou os subgêneros anteriormente propostos para gêneros, com exceção de *Prophlebotomus*. Em 1955, Fairchild introduziu os gêneros *Warileya* e *Hertigia*, defendendo que apenas estes, e o gênero *Phlebotomus*, deveriam ser aceites. Theodor, em 1965, refuta a proposta de Fairchild e propõe uma nova classificação, sustentada nas características do cibário e nas genitálias masculina e feminina, mantendo os gêneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya* e *Hertigia*, para o Novo Mundo. Em 1977, Abonnec definiu os gêneros *Spelaephlebotomus* e *Idiophlebotomus*. Entre 1977 e 1982, Lewis reformulou a classificação de Abonnec, e manteve a atribuição de gênero aos flebotomíneos *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. (Rispaill & Léger, 1998; Depaquit & Léger, 2017). Posteriormente, Leng (1987) descreveu o gênero *Chinius*, para flebotomos com uma distribuição mais restrita, nomeadamente na China.

Até ao início dos anos 90, do século XX, a classificação taxonômica dos gêneros manteve-se estável, tendo sido, então, introduzidas novas alterações a partir de um conjunto de características da morfologia interna da espermateca das fêmeas, cibário e faringe. Em 1991, Artemiev separou a família Phlebotominae em duas tribos: Phlebotomini e Idiophlebotomini, com 17 e 5 gêneros respetivamente. Em relação ao Novo Mundo, a classificação proposta por Lewis e colaboradores (1977), e revista por Young & Duncan (1994), considera-se a mais estável (Akhoundi *et al.*, 2016). No entanto, Galati (1995) ao realizar estudos morfológicos e filogenéticos, reorganizou a subfamília Phlebotominae e dividiu-a nas tribos Phlebotomini e Hertigiini. A mesma Investigadora, até 2013 (Galati, 2013), elevou vários subgêneros do gênero *Lutzomyia* a gêneros e, apesar de ainda em debate, fez uma revisão da sua inicial proposta e definiu que na tribo Phlebotomini devem ser incluídas cerca de 930 espécies e na tribo Hertigiini cerca de 30, independentemente da sua distribuição no Velho ou no Novo Mundo. Assim, de acordo com esta classificação, os flebotomíneos com implicações na transmissão das leishmanioses no Novo Mundo, não são apenas exclusivos do gênero *Lutzomyia*, o que alterou este paradigma, mas distribuem-se também por outros 13 gêneros. Presentemente, no Novo Mundo, ambas as classificações propostas, ou seja,

por Young & Duncan (1994) e Galati (2013) são reconhecidas e referidas na literatura científica. No entanto, a classificação de Galati (2013) começa a ser mais aceite e valorizada (Rispaill & Léger, 1998; Galati, 2003; Depaquit & Léger, 2017; Dvorak, *et al.*, 2018). Pelo acima exposto, a classificação taxonómica dos flebotomíneos, até à presente data, não se pode considerar definitiva.

## 1.2 Distribuição geográfica dos flebotomíneos

Os flebotomíneos apresentam uma vasta distribuição e ocorrem numa grande variedade de biótopos das regiões tropicais, subtropicais e temperadas, em climas do tipo tropical húmido ou seco, mediterrânico e desértico, entre 50° latitude N e 40° latitude S (Lane, 1993; Killick-Kendric, 1999; Naucke *et al.*, 2008; Depaquit & Léger, 2017). A sua distribuição pode, ou não, ser coincidente com a distribuição do protozoário do género *Leishmania*. Na região australiana, apesar de diversas espécies flebotomínicas serem conhecidas, não há registo de casos autóctones de leishmaniose humana ou canina (Afonso & Alves-Pires 2008).

Em relação à altitude, os flebotomos podem ser encontrados abaixo do nível do mar, em áreas circundantes do Mar Morto, e até aos 3000 metros, nos Andes e no Afeganistão. As barreiras físicas podem também ser condicionantes na distribuição dos flebotomíneos, tal como o coberto vegetal, tipo, e uso dos solos (Afonso & Alves-Pires 2008). De acordo com Killick-Kendric (1999), não existem flebotomíneos na Nova Zelândia e nas ilhas do Pacífico. Na figura 1, encontra-se a distribuição dos géneros flebotomínicos do Velho e do Novo Mundo.

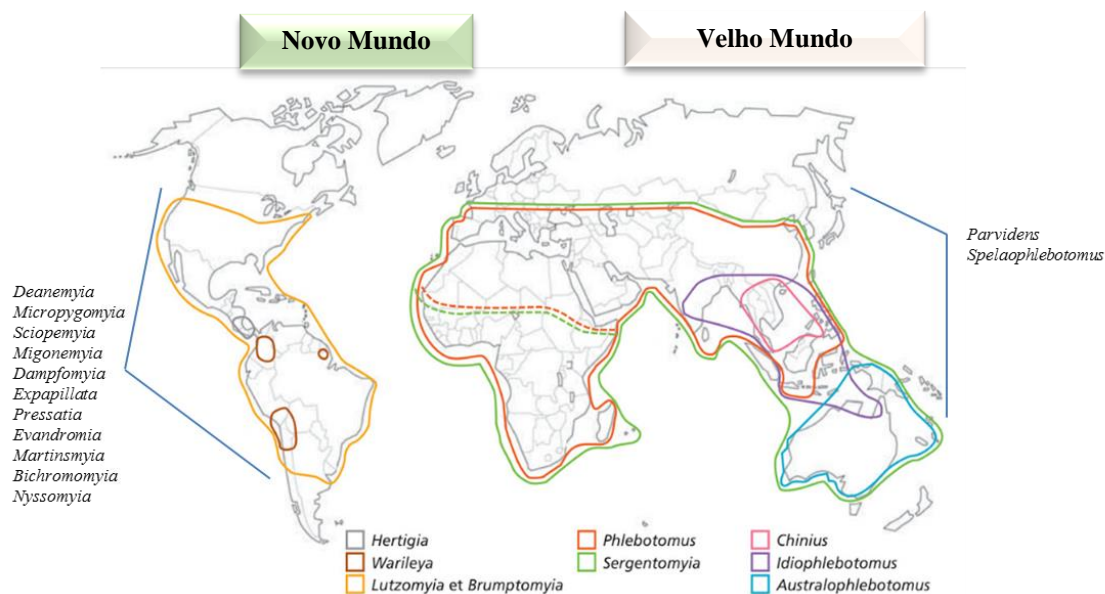


Fig. 1 - Mapa em que estão mencionados gêneros de flebotomos do Velho e do Novo Mundo. À esquerda e à direita, encontram-se também os gêneros flebotomínicos, existentes nas referidas regiões, de acordo com a classificação de Galati (2003; 2013) (Adaptado de Depaquit & Léger, 2017)

### 1.3 Importância Médica e Veterinária dos flebotomos como agentes de Harara e vetores de *Leishmania* spp., *Bartonella* sp., e arbovírus

Sendo as fêmeas flebotomínicas hematófagas, a própria picada, devido ao tipo da mesma e/ou à inoculação da saliva, pode provocar reações alérgicas uma vez que as fêmeas são telmofágicas (*pool feeding*) e os componentes da saliva contêm substâncias alérgicas, que variam de espécie para espécie. Os seres humanos podem desenvolver reações alérgicas graves, apresentando prurido, náuseas, febre, edemas, mais ou menos generalizados, e ainda alterações do ritmo cardíaco, ao que o conjunto destes sintomas e sinais se denomina Harara. A reação alérgica grave à picada, ou Harara, é normalmente associada à presença/picada de *Phlebotomus papatasi*, *P. neglectus* e *P. alexandri* (Depaquit & Léger, 2017).

Apesar das referidas reações à picada dos flebotomíneos, o interesse *major* dos flebotomos, em Medicina humana e veterinária, deve-se, essencialmente, aos agentes patogénicos que transmitem aos hospedeiros vertebrados, quer se tratem de humanos, quer de animais.

No que diz respeito à leishmaniose, causada, pelo menos, por 20 espécies do género *Leishmania*, estima-se que 0,7 a 1 milhão de novos casos humanos (leishmaniose visceral e cutânea) são reportados, por ano, em aproximadamente 100 países endémicos (Burza *et al.*, 2018). Algumas destas doenças parasitárias estão associadas exclusivamente aos seres humanos sendo, portanto, consideradas antroponoses. Como exemplo deste tipo de leishmaniose, considera-se a leishmaniose cutânea urbana, ou Botão do Oriente, em que o agente patogénico é a espécie *Leishmania tropica* e o vetor é uma espécie fortemente antropofílica e endofílica, nomeadamente *Phlebotomus sergenti*. Contudo, *L. tropica* foi já isolada a partir de roedores e canídeos, mas, até à presente data, tudo leva a crer que os focos humanos desta parasitose não necessitam da intervenção de um reservatório animal, com exceção de alguns focos zoonóticos na África Oriental e no Próximo Oriente, onde aqueles são reservatórios.

No que diz respeito à leishmaniose cutânea zoonótica, ou rural, de zonas áridas e quentes, ou desérticas, que se encontram nas regiões mediterrânicas e no Próximo e Médio Oriente, esta é causada por *L. major*, cujo vetor é *P. papatasi* que, tal como *P. sergenti*, é principalmente antropofílico. A referida espécie de *Leishmania* tem como reservatórios roedores silváticos (gerbilos, *Psammomys obesus*). Assim, esta variedade de leishmaniose não necessita de um animal doméstico, como reservatório, sendo, portanto, os seus focos habituais localizados na periferia das cidades e nas aldeias isoladas (Fig. 2).



Fig. 2 - Biótopo correspondente a uma zona árida e quente do Irão, onde existem vários abrigos para pequenos roedores, que atuam como reservatórios, favorecendo o ciclo zoonótico de leishmaniose cutânea (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

Presentemente, a tendência dos ciclos silváticos é para a domesticação, ainda que no continente americano, por outros vetores e outras espécies de leishmanias, ainda se mantenham numerosos focos estritamente silváticos.

Como exemplo de leishmaniose humana, de tipo zoonótico, considera-se a leishmaniose visceral por *L. infantum*, que se encontra no Velho e no Novo Mundo. Trata-se assim, de uma zoonose em que os cães são os principais reservatórios e em que a leishmaniose canina constitui um verdadeiro flagelo no âmbito da saúde animal. Os vetores têm uma grande plasticidade trófica, sendo estes, no Velho Mundo, os seguintes: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus* e ainda outros do subgénero *Larrousius*. No Novo Mundo, *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor (Depaquit & Léger, 2017).

No que diz respeito às formas clínicas humanas, a leishmaniose visceral, causada por *L. donovani* na Ásia e em África, e por *L. infantum* na Bacia Mediterrânica, Médio Oriente, Ásia Central e Américas Central e do Sul, são as formas sistémicas mais severas que causam, normalmente, a morte quando não tratadas. A Leishmaniose cutânea pós Kalazar é a manifestação cutânea que ocorre, vulgarmente, em pessoas, saudáveis, depois de terem sofrido o tratamento para a leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea provoca, na maior parte das vezes, uma úlcera, que cura espontaneamente, mas que pode dar origem a cicatrizes desfigurantes. Dependendo das espécies dos parasitas, mais de 10% das leishmanioses cutâneas progridem para manifestações cutâneas severas, tais como a leishmaniose mucocutânea, cutânea difusa, cutânea disseminada e leishmaniose recidivante (Bursa *et al.*, 2018).

A bartonelose humana, também conhecida por Febre de Oroya, ou Verruga Peruana, é uma infeção bacteriana, por *Bartonella bacilliformis*, endémica na região dos Andes (Perú, Colômbia e Equador) e transmitida por flebotómíneos do género *Lutzomyia* (segundo a classificação clássica). Na fase aguda da Febre de Oroya, o paciente apresenta uma anemia hemolítica e temperaturas elevadas. Sem tratamento, a infeção pode conduzir à morte. A forma crónica, ou Verruga Peruana, dá origem a uma erupção cutânea benigna e os vetores são *Lutzomyia verrucarum* (*Pintomyia verrucarum*, segundo Galati, 2013), no Peru, e *Lu. columbiana* na Colômbia (*Pintomyia columbiana*).

Os arbovírus, transmitidos por flebótomos, pertencem aos géneros *Phlebovirus*, *Orbivirus*, *Vesiculovirus* e *Flavivirus* (Lane, 1993; Killick-Kendrick, 1999; Moureau *et al.*, 2010). Tanto os machos como as fêmeas podem encontrar-se infetados e infetantes, estando demonstrado que a infeção ocorre transovaricamente, sexualmente e através de refeições sanguíneas (Depaquit, & Léger, 2017; Iriso *et al.*, 2017<sup>a</sup>).

Os flebovírus são os agentes causais da Febre dos três dias, ou Febre de papataci, e incluem o vírus Toscana, Nápoles e Sicília. Estes vírus circulam na Bacia do Mediterrâneo e no Médio Oriente, através de várias espécies de flebótomos, sendo o número de casos febris largamente subestimado, uma vez que os sintomas podem ser facilmente confundidos com síndromes gripais, quando não é afetado o sistema nervoso central (Depaquit, & Léger, 2017).

O vírus Toscana é o mais importante dos vírus anteriormente referidos, dado o seu neurotropismo no ser humano, atingindo o sistema nervoso central. É o principal responsável por meningites víricas nos meses de verão, na Bacia do Mediterrâneo, especialmente em Itália, Espanha, Chipre e Portugal. Tem como vetores as espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. perfiliewi*. *Sergentomyia minuta*, por técnicas moleculares, foi detetada infetada em França (Bichaud *et al.*, 2014).

Em Portugal, o primeiro caso registado foi num turista Sueco, que desenvolveu uma meningoencefalite contraída no Algarve, em 1985. Também um turista alemão, em 1996, desenvolveu meningite após ter regressado de Coimbra. Mais recentemente, no Porto, entre 2002 e 2005, este vírus foi identificado como agente causal de 5,6% dos doentes estudados com meningite asséptica (Santos, *et al.*, 2007). Num outro estudo, entre 2004 e 2008, foi detetada uma seroprevalência de 4,2% em doentes com doença neurológica, verificando-se quatro casos de meningite e dois de meningoencefalite (Amaro *et al.*, 2011).

Os vírus Nápoles e Sicília, não atingem o sistema nervoso central, mas podem ser muito debilitantes. A doença causada por estes vírus já foi identificada em vários países da Bacia do Mediterrâneo e do Médio Oriente. Durante a II Guerra Mundial, a febre por flebótomos foi uma das mais sérias ameaças à capacidade das tropas, no terreno, chegando a taxa de infeção, em algumas unidades, aos 50% (Hilborne & Golomb, 2001; Hyams *et al.*, 2001). Nos anos 80 (século XX), tropas russas ficaram infetadas com estes vírus, quando entraram num foco não conhecido no Afeganistão, e o mesmo

aconteceu com tropas das Nações Unidas, no Chipre (Service, 2001). Apesar disso, até à data, não são conhecidas quais as principais espécies flebotômicas vetoras destes arbovírus (Afonso & Alves-Pires, 2008). Em Portugal, foi ainda identificada um novo vírus deste grupo, provisoriamente, denominado de Vírus da Arrábida, o que está de acordo com outros estudos realizados, que mostram que uma grande diversidade de arbovírus pode coexistir na mesma região, dificultando assim, a sua correta identificação (Amaro *et al.*, 2016). Estes vírus têm uma elevada taxa de mutação, o que facilmente poderá levar à identificação de uma nova geração de vírus, como já aconteceu em Itália (Moriconi *et al.*, 2017; Calzolari *et al.*, 2018).

Os orbivírus transmitidos por flebótomos restringem-se a um serogrupo denominado Changuicola. A transmissão aos seres humanos é considerada excepcional e só ocorre a partir de espécies vetoras do Novo Mundo (Depaquit & Léger, 2017).

Os vesiculovírus, ou vírus da estomatite vesicular, são conhecidos em diversos animais ligados à agropecuária. As pessoas podem também ser infetadas, acidentalmente, não havendo registos de graves danos para a saúde humana, ainda que na América do Sul se verifiquem casos esporádicos de encefalites. Em Itália e na Sérvia, já foram isolados vesiculovírus em *P. perfiliewi*. Na Índia, onde os vesiculovirus são endémicos, suspeita-se que as espécies dos géneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* sejam responsáveis pela transmissão a humanos (Maroli, *et al.*, 2013; Depaquit, & Léger, 2017).

#### **1.4 Espécies flebotômicas comprovadamente vetoras de *Leishmania* spp. no Velho e Novo Mundo: critérios de incriminação**

Segundo Killick-Kendrick (1990), para que uma espécie flebotômica seja considerada comprovadamente vetora de *Leishmania* sp., terá que apresentar:

- a) Tendência antropofílica ou zooantropofílica,
- b) Distribuição coincidente do flebótomo, do parasita e do vertebrado (vetor / *Leishmania* / Homem e/ou animal) - forte associação ecológica, incluindo sazonalidade,

- c) Fêmea encontrada na Natureza com formas infetantes de *Leishmania* sp. na válvula estemodal e da mesma espécie/zimodeme que a encontrada nos seres humanos e/ou animal,
- d) Desenvolvimento completo de *Leishmania* sp. no flebótomo (ciclo intravetorial) e capacidade de transmissão,
- e) Longevidade da fêmea flebotomínica superior ao período de incubação extrínseca do parasita.

Mais recentemente, novos critérios foram acrescentados por Ready (2013), nomeadamente:

- f) Transmissão experimental (xenodiagnóstico),
- g) Abundância da espécie flebotomínica,
- h) Uso de dados retrospectivos - modelos matemáticos - demonstrarem que o vetor é essencial para a manutenção da transmissão, com ou sem o envolvimento de outros vetores,
- i) Modelos matemáticos, baseados em programas de controlo planeado, demonstrarem que a incidência da doença decresce significativamente a seguir ao decréscimo, significativo, da “biting density” do vetor específico.

Maroli e colaboradores (2013), por considerarem que o preenchimento de todos os critérios acima definidos, poderiam ser demasiadamente restritivos, ou mesmo omitir espécies com importância para a transmissão das leishmanioses, consideraram que são suficientes a coexistência dos seguintes aspetos:

- j) A sobreposição geográfica de flebotomíneos infetados com *Leishmania* e casos humanos de leishmaniose,
- k) O comportamento antropofílico/zooantropofílico da espécie em causa.

De acordo com Maroli *et al.*, (2013), verificam-se várias espécies flebotomínicas comprovadamente vetoradas, ou suspeitas, de espécies de leishmanias, em países do Velho (Quadro 1) e do Novo Mundo (Quadro 2).

Quadro 1 - Espécies flebotomínicas vetoras, ou suspeitas, de leishmanioses no Velho Mundo, e as formas clínicas, comuns e raras, em humanos, das mesmas regiões

Espécie flebotomínica comprovadamente vetora ou suspeita	<i>Leishmania</i> sp.	País*	Forma clínica em humanos	
			Comum	Rara
<i>Phlebotomus argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	Bangladeche, Índia*, Nepal*, Sri Lanca	LV, LCPK	LCL
<i>P. celiae</i>		Etiópia*, Quênia		
<i>P. longiductus</i>		China		
<i>P. martini</i>		Etiópia*, Quênia*, Somália, Uganda		
<i>P. orientalis</i>		Chade, Etiópia, Quênia, Arábia Saudita, Iémen, Sudão*		
<i>P. vansonerena</i>		Quênia		
<i>P. alexandri</i>	<i>L. donovani</i> s.l./ <i>L. infantum</i>	China*, Irão, Iraque, Omã	LV	LCL, LCD*
<i>P. ariasi</i>	<i>L. infantum</i>	Argélia, França*, Itália, Portugal*, Espanha*, Marrocos	LV	LCL, LCD*
<i>P. balcanicus</i>		Arménia, Geórgia*		
<i>P. chinensis</i>		China*		
<i>P. galileus</i>		Síria		
<i>P. halapensis</i>		Azerbaijão, Geórgia, Síria		
<i>P. kandelakii</i>		Arménia, Azerbaijão Geórgia*, Irão		
<i>P. langeroni</i>		Egipto*, Espanha, Tunísia*		
<i>P. longicuspis</i>		Argélia, Marrocos, Tunísia		
<i>P. longiductus</i>		Cazaquistão*, Quirguistão, Ucrânia e Uzbequistão, Irão*		
<i>P. neglectus</i>		Albânia* Chipre, Croácia, Grécia*, Kosovo, Itália, República da Macedónia, Monte Negro, Roménia, Eslovénia, Turquia, Ucrânia		
<i>P. perfiliewi</i>		Albânia, Argélia*, Croácia, Grécia, Israel, Itália* Malta, Marrocos, Palestina, República da Macedónia, Roménia, Tunísia, Turquia		
<i>P. perniciosus</i>		Argélia*, França*, Itália*, Malta* Mónaco, Marrocos, Portugal*, Espanha, Tunísia		
<i>P. sichuanensis</i>		China*		
<i>P. smirnovi</i>		China*, Cazaquistão		
<i>P. syriacus</i>		Grécia, Israel, Líbano, Palestina, Síria, Turquia, Albânia*, Croácia, Chipre*, Grécia, Israel, Síria, Turquia*		
<i>P. tobbi</i>		Albânia*, Croácia, Chipre*, Grécia, Israel, Síria, Turquia*		
<i>P. transcaucasicus</i>		Azerbaijão, Irão*, Turquia		
<i>P. turanicus</i>		Turquemenistão*		
<i>P. wui</i>		China*		
<i>P. aculeatus</i>	<i>L. tropica</i>	Quênia	LCL, LR	LV*
<i>P. arabicus</i>		Israel*, Etiópia		
<i>P. shabaidi</i>		Marrocos, Tunísia		
<i>P. guggisbergi</i>		Quênia *		
<i>P. rossi</i>		Namíbia*		
<i>P. saevus</i>		Etiópia*		

<i>P. sergenti</i>		Afeganistão*, Argélia*, Azerbaijão, Etiópia*, Grécia, Irão*, Iraque, Israel*, Jordânia, Líbia, Marrocos*, Paquistão, Palestina, Arábia Saudita*, Síria, Tunísia*, Turquia, Turquemenistão Uzbequistão, Iémen		
<i>P. ansarii</i>	<i>L. major</i>	Irão	LCL	LCD*
<i>P. caucasicus</i>		Afeganistão, Irão*		
<i>P. duboscqi</i>		Burquina-Faso, Camarões, Chade, Etiópia*, Gambia, Gana, Guiné, Guiné Bissau, Quênia*, Mali*, Mauritânia, Níger, Nigéria, Senegal*, Sudão, Iémen		
<i>P. mongolensis</i>		Cazaquistão		
<i>P. papatasi</i>		Afeganistão*, Argélia*, Azerbaijão, Egípto*, Irão*, Iraque*, Israel* Jordânia*, Cazaquistão, Líbia, Marrocos*, Omã, Paquistão, Palestina, Arábia Saudita*, Sudão, Síria, Tunísia*, Turquemenistão*, Uzbequistão*, Iémen		
<i>P. salehi</i>		Índia*, Irão*, Paquistão		
<i>P. bergeroti</i>		Burquina-Faso, Chade, Egípto, Irão, Mauritânia, Omã, Iémen		
<i>P. longipes</i>	<i>L. aethiopica</i>	Etiópia*	LCL	LCD
<i>P. pedifer</i>		Quênia*, Etiópia*		
<i>P. sergenti</i>		Etiópia*		

\* Países na qual a espécie flebotomínica é comprovadamente vetora, ou suspeita na evidência de aspetos epidemiológicos, ou, ainda, comprovadamente vetor em outro local. \* Em casos de severa imunossupressão (isto é VIH coinfeção); LCD - Leishmaniose cutânea disseminada ou difusa; LCL - Leishmaniose cutânea localizada; LR - Leishmaniose recidivante; LCPK - Leishmaniose cutânea pós kala-azar; LV - Leishmaniose visceral (Adaptado de Maroli *et al.*, 2013)

Quadro 2 - Espécies flebotomínicas vetoras, ou suspeitas, de leishmanioses no Novo Mundo, e as formas clínicas, comuns e raras, em humanos das mesmas regiões

Espécie flebotomínica comprovadamente vetora ou suspeita	<i>Leishmania sp.</i>	País*	Forma clínica em humanos	
			Comum	Rara
<i>Lutzomyia almerioi</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil*	LV	LCL, LCD*
<i>Lu. cruzi</i>		Brasil*		
<i>Pintomyia evansi</i>		Colômbia *, Costa Rica, México, Nicarágua, Venezuela*		
<i>Lu. foratirii</i>				
<i>Lu. longipalpis</i>		Argentina*, Bolívia*, Brasil*, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras*, México, Nicarágua, Paraguai, Venezuela*		
<i>Migonemyia migonei</i>		Argentina, Brasil		
<i>Lu. pseudolongipalpis</i>		Venezuela		
<i>Evandromyia</i>		Brasil		

<i>sallei</i>				
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	<i>L. braziliensis</i>	Bolívia	LCL	LMC, LCD*
<i>P. carrerai</i>		Bolívia*		
<i>Pintomyia colombiana</i>		Colômbia		
<i>Psychodopygus complexus</i>		Brasil *		
<i>Lu. criciata</i>		México		
<i>Ev. edwardsi</i>		Brasil		
<i>Pintomyia shicheri</i>		Brasil *		
<i>Lu. gomezi</i>		Venezuela*		
<i>Ny. intermedia</i>		Brasil, Guiana Francesa, Paraguai		
<i>Psychodopygus llanosmartinzi</i>		Bolívia*		
<i>Migonemyia migonei</i>		Argentina, Brasil*, Paraguai		
<i>Ny. neivai</i>		Argentina, Brasil*		
<i>Pintomyia nuneztovari</i>		Bolívia*		
<i>Pintomyia ovallesi</i>		Belize, Colômbia, Guatemala*, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Venezuela*		
<i>Psychodopygus panamensis</i>		Guatemala*, Honduras, Nicarágua Panamá, Venezuela*		
<i>Psychodopygus paraensis</i>		Brasil		
<i>Lu. pescei</i>		Perú		
<i>Pintomyia pessoai</i>		Brasil		
<i>Pintomyia pia</i>		Colômbia		
<i>Ny. shawi</i>		Bolívia*		
<i>Pintomyia spinicrassa</i>		Colômbia*, Venezuela*		
<i>Lu. tejadai</i>		Perú		
<i>Pintomyia townsendi</i>		Colômbia		
<i>Micropygomyia trinidadensis</i>		Venezuela		
<i>Ny. ylephiletor</i>		Guatemala *, Honduras		
<i>Pintomyia youngi</i>		Costa Rica, Venezuela, Colômbia		
<i>Psychodopygus yucumensis</i>		Bolívia*		
<i>Psychodopygus wellcomei</i>		Brasil*, Guiana Francesa		
<i>Ny. whitmani</i>		Argentina, Brasil*, Paraguai		
<i>Ny. anduzei</i>	<i>L. guianensis</i>	Brasil*, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela	LCL	LMC
<i>Lu. ayacuchensis</i>		Perú*		
<i>Pintomyia longiflocosa</i>		Colômbia		
<i>Mygonemia migonei</i>		Venezuela		
<i>Ny. shawi</i>		Bolívia*		
<i>Ny. umbratilis</i>		Brasil*, Colômbia*, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Suriname		
<i>Ny. whitmani</i>		Brasil*		

<i>Danpgomya anthophora</i>	<i>L. mexicana</i>	E.U.A.	LCL	LMC, LCD*
<i>Lu. ayacuchensis</i>		Equador*		
<i>Pintomya colombiana</i>		Colômbia		
<i>Lu. cruciata</i>		México, Nicarágua		
<i>Lu. diabolica</i>		E.U.A.		
<i>Mygonemia migonei</i>		Venezuela		
<i>Bichromomyia olmeca</i>		Belize, Guatemala, México*		
<i>Pintomya ovallesi</i>		Venezuela *		
<i>Psychodopygus panamensis</i>		México		
<i>Psathyromyia shannoni</i>		México		
<i>Ny. ylephiletor</i>		Guatemala, México		
<i>Bichromomyia favigutellata</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil*, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela	LCL	LCD
<i>Lu. longipalpis</i>		Brasil*		
<i>Pintomyia nuneztovari</i>		Bolívia*		
<i>Bichromomyia olmecta reducta</i>		Brasil*, Venezuela		
<i>Bichromomyia olmecta nociva</i>		Brasil*		
<i>Lu. cruciata</i>	<i>L. panamensis</i>	Nicarágua, Panamá	LCL	LMC
<i>Lu. gomezi</i>		Colômbia*, Equador, Panamá		
<i>Lu. artmanni</i>		Equador*		
<i>Psychodopygus panamensis</i>		Colômbia*, Honduras, Panamá*		
<i>Lu. sanguinaria</i>		Panamá		
<i>Ny. trapidoi</i>		Colômbia*, Costa Rica, Equador, Honduras, Nicarágua, Panamá*		
<i>Ny. ylephiletor</i>		Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá		
<i>Ny. yuilli</i>		Colômbia *		
<i>Lu ayacuchensis</i>	<i>L peruviana</i>	Perú*	LCL	LMC
<i>Pyntomyia verrucarum</i>		Perú*		
<i>Pyntomyia nunestovari</i>	<i>L. lainsoni</i>	Bolívia*	LCL	
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>		Brasil*, Perú		
<i>Ny. whitamani</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil*	LCL	
<i>Psychodopygus amazonensis</i>	<i>L. naiffi</i>	Brasil	LCL	
<i>Psychodopygus ayrozai</i>		Brasil*		
<i>Psychodopygus squamiventri</i>		Brasil*		
<i>Ny. antonesi</i>	<i>L. lindenbergi</i>	Brasil	LCL	
<i>Pyntomyia youngi</i>	<i>L. garnhani</i>	Venezuela	LCL	LMC
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<i>L. piganoi</i>	Venezuela	LCD	

<i>Bichromomya ollmeca bicolor</i>	<i>L. venezuelensis</i>	Venezuela	LCL	LCD
<i>Lu. hartemanni</i>	<i>L. venezuelensis</i>	Colômbia*	LCL	LCD
<i>Lu gomezi</i>		Panamá		
<i>Psychodopygus panamensis</i>		Panamá		

\* Países na qual a espécie flebotomínica é comprovadamente vetora, ou suspeita na evidência de aspetos epidemiológicos, ou, ainda, comprovadamente vetor em outro local. \* Em casos de severa imunossupressão (isto é, VIH coinfeção). LCD - Leishmaniose cutânea disseminada ou difusa; LCL - Leishmaniose cutânea localizada; LR - Leishmaniose recidivante; LCPK - Leishmaniose cutânea pós kala-azar; LV - Leishmaniose visceral (Adaptado de Maroli *et al.*, 2013). Para as espécies flebotomínicas do Novo Mundo, foi adotada, neste Quadro, a classificação de Galati (2003, 2013, 2016).

### 1.5 Principais características morfológicas dos flebotomíneos: adultos e imaturos

Os flebotomíneos adultos são insetos de reduzidas dimensões, apresentando 2 a 3 mm de comprimento (Fig. 3), com sedas distribuídas pelas diferentes áreas do corpo, e em que a cor/tonalidade varia entre o cinzento e o castanho, claro ou escuro. O corpo é constituído pela cabeça, tórax e abdómen, e na cabeça, encontram-se antenas longas, do tipo 2+x, idênticas em ambos os sexos, e os palpos igualmente longos (Fig. 4). O tórax é arqueado, e, neste, inserem-se três pares de patas longas, e um par de asas lanceoladas em que a segunda nervura longitudinal é bifurcada duas vezes. Esta característica é específica da subfamília Phlebotominae (Fig. 5). Os flebotomíneos apresentam dimorfismo sexual acentuado (Figs. 6 e 7).

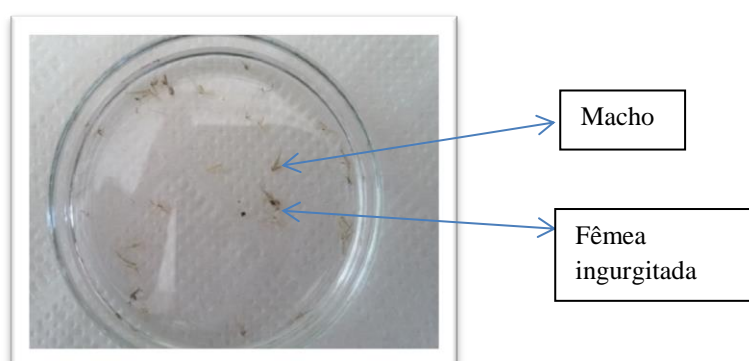


Fig. 3 - Flebotomíneos de ambos os sexos (em etanol e capturados no Alentejo, Portugal, 2017). Fotografia de S. Pereira

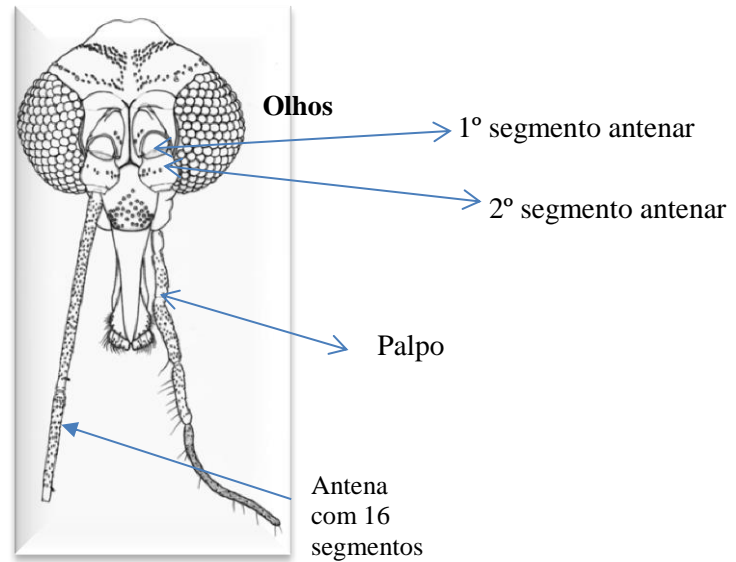


Fig. 4 - Aspeto geral da cabeça de um flebotomíneo  
 (Adaptado de <https://zenodo.org/record/277086#.WwGhX-4vzIU>) (Acedido a 9 de julho de 2018)

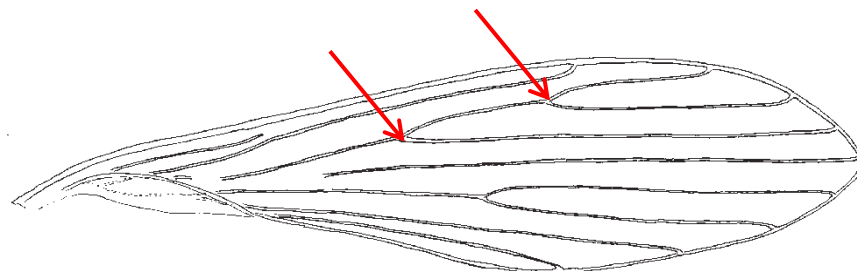


Fig. 5 - Esquema da asa de um flebotomíneo. Observa-se a segunda nervura longitudinal bifurcada duas vezes (setas vermelhas). (Adaptado de Andrade Filho *et al.*, 2004)

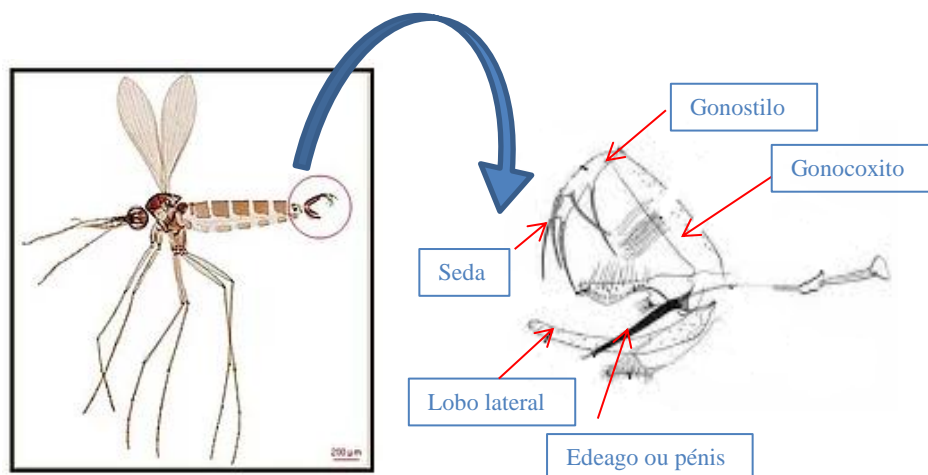


Fig. 6 - Extremidade posterior do abdômen de um flebotomo macho e principais estruturas da genitália externa (Adaptado de Lane, 1993).

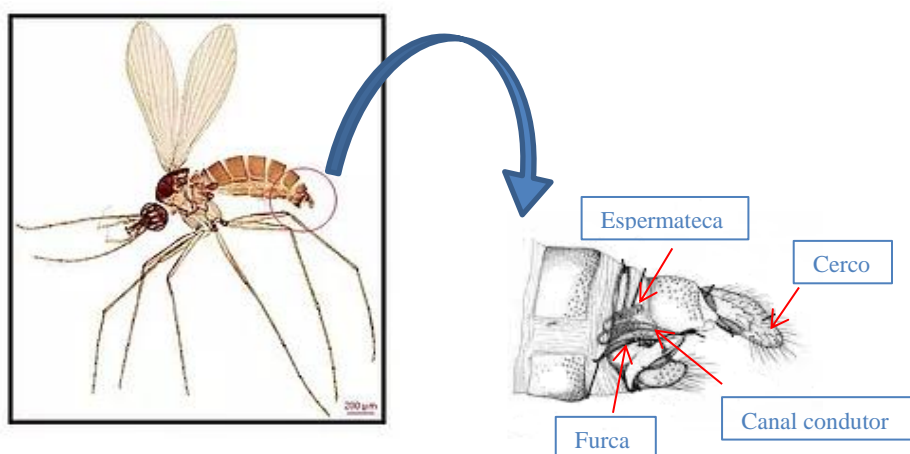


Fig. 7 - Extremidade posterior do abdômen de um flebotomo fêmea e principais estruturas da genitália externa e interna (Adaptado de Lane, 1993)

Relativamente à morfologia externa dos flebotomíneos imaturos, os ovos têm uma forma elipsoide, são de cor castanha e têm cerca de 0,4 mm de comprimento. As larvas têm um aspeto vermiforme, de cor branca/nacarada, e apresentam quatro estados (L1, L2, L3 e L4). No último estado de desenvolvimento, podem atingir 8 mm de comprimento

(Antoine, 1994). O corpo está dividido em cabeça quitinizada, tórax e abdómen. O tegumento apresenta sedas espinhosas e no último segmento abdominal inserem-se duas sedas caudais no 1º estado e quatro nos restantes (Fig. 8).



Fig. 8 - Larvas de flebotomíneos, do primeiro (L1) ao último estado (L4) (Adaptado de [http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand\\_fly.html](http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html)) (Acedido a 9 de julho de 2018)

As pupas são ligeiramente globosas, de cor branca/amarela, com cerca de 3 mm de comprimento e o corpo está dividido em cefalotórax e abdómen. Nos últimos segmentos abdominais encontra-se a exúvia larvar (Fig. 9).

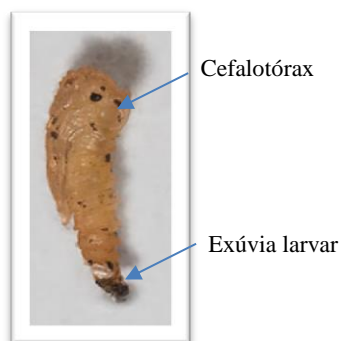


Fig. 9 - Pupa de flebotomíneo (Adaptado de Halada *et al.*, 2018)

## 1.6 Ciclo de vida e aspetos bioecológicos de flebotomíneos: Velho e Novo Mundo

Os flebotomíneos são insetos holometabólicos, apresentando metamorfoses completas: ovos, larvas, pupas e adultos. Tanto os machos como as fêmeas são fitófagos, alimentando-se de açúcares de plantas, ou produzidos por afídeos. No entanto,

as fêmeas, para que se realize a maturação ovárica, necessitam de efetuar refeições sanguíneas. Apesar disso, algumas espécies flebotômicas podem ser autogênicas (*P. papatasi*), isto é, capazes de efetuarem uma postura sem realizarem uma refeição sanguínea (Lucientes *et al.*, 2005; Chelbi & Zhioua, 2007). Também a partenogênese, isto é, não ser necessária a cópula para que se efetue posturas, apesar de rara, já foi reportada, nomeadamente em espécies do Novo Mundo (Brazil & Oliveira, 1999; Alves *et al.*, 2008). Anomalias morfológicas, externas e internas, nos machos e nas fêmeas, foram observadas em flebótomos, capturados no terreno, em que apresentavam ginandromorfismo, ou seja, flebótomos com a genitália externa correspondente a um macho e que, internamente, apresentava a espermateca de uma fêmea e vice-versa. Contudo, segundo os autores, o número de exemplares capturados nestas circunstâncias foi reduzido (Gallego *et al.*, 1991).

O ciclo de vida dos flebótomos apresenta, contrariamente a outros insetos com importância médica, uma fase terrestre (formas imaturas) e uma fase aérea (adultos ou imagos). As posturas, em agregados de 30 a 70 ovos, de acordo com a espécie e condições ambientais, são realizadas em locais não expostos ao sol, com humidade e em substratos ricos em matéria orgânica. As larvas apresentam mobilidade, através das sedas ventrais, são fitófagas e saprófagas, e possuem um aparelho bucal mastigador desenvolvido que lhes permite alimentarem-se da matéria orgânica disponível (Brazil & Brazil, 2003). As pupas são imóveis e fixas ao substrato através da exúvia larvar. Estas, não se alimentam e sofrem uma reorganização dos tecidos e órgãos até à eclosão dos adultos.

Na Natureza, a duração do ciclo de vida, de ovo à eclosão do adulto, varia entre 45 a 60 dias (Fig. 10), dependendo da espécie, e de fatores bióticos e abióticos. Contrariamente ao que se verifica no Novo Mundo, no Velho Mundo, os flebotomíneos têm uma marcada sazonalidade cessando a sua atividade abaixo dos 12°C, e entram em diapausa no estado larvar. Em Portugal, Espanha e outros países da Bacia Mediterrânica, os adultos eclodem na primavera, nos meses de abril/maio e entram em diapausa em outubro/novembro, dependendo das espécies, regiões e condições climáticas e ambientais (Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Pires 2000; Alten, *et al.*, 2016).

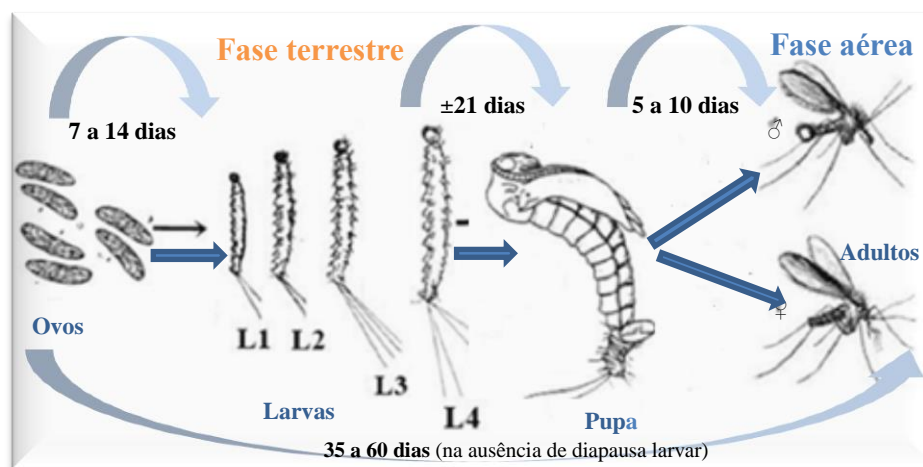


Fig. 10 - Ciclo de vida dos flebotomos: ovos, larvas, pupa, adultos, e duração aproximada de um estado a outro (Adaptado de Afonso & Alves-Pires, 2008 e de [http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life\\_cycle\\_habitats.htm](http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm)) (Acedido a 9 de julho de 2018)

Consoante as espécies, regiões, condições climáticas e ambientais, e até o ano em que se realiza o estudo da densidade flebotomínica, a atividade sazonal pode apresentar uma tendência monofásica ou difásica, o que corresponde a um ou dois picos de eclosão de imagos, por ano, respetivamente. Já nos climas subtropicais e tropicais, o número de gerações anuais pode variar entre cinco a sete, ou seja, em determinadas regiões do Novo Mundo poderá verificar-se a existência de adultos durante todo o ano. Contudo, excecionalmente, *Lutzomyia olmeca* pode entrar em diapausa na fase de ovo (Meira & Ferreira, 1944; Rés, 1957; Pires, 2000; Afonso *et al.*, 2005).

Segundo Depaquit & Léger (2017), na Natureza, os adultos, fêmeas, apresentam uma longevidade entre duas semanas a dois meses, em contraste com os machos que têm uma longevidade mais reduzida. Foi comprovado, com exemplares da mesma espécie, criados laboratorialmente e capturados no terreno, que os machos quando eclodem, necessitam de um período de pelo menos 24h para que se dê a rotação completa da genitália externa (180°), facto este, essencial para a cópula. Assim, quando se fazem capturas no terreno, através de armadilhas luminosas tipo CDC, e se observam machos com a genitália não rodada ou parcialmente rodada, poder-se-á admitir que as armadilhas foram colocadas próximas, ou muito próximas, dos locais de eclosão. Este aspeto tem importância uma vez que é extremamente difícil localizar os criadouros

larvares e consequentes adultos recém eclodidos (Ferrolho *et al.*, 2015). Na Natureza, os flebotomíneos machos, resultantes da mesma postura, geralmente eclodem antes das fêmeas para que se possa dar a rotação da genitália externa e a consequente cópula entre os imagos da mesma espécie. A cópula acontece imediatamente antes ou após a realização da refeição sanguínea, com uma duração variável entre 30s a 5 min, e durante o período crepuscular e/ou noturno (Depaquit & Léger, 2017). Este comportamento está relacionado com a vibração das asas e a libertação de feromonas de glândulas abdominais dos flebotomíneos machos (Brazil & Brazil, 2003).

Os flebotomíneos apresentam atividade crepuscular e/ou noturna, com uma fraca dispersão, voo irregular e a uma altitude de 1,5 metros. No entanto, as distâncias variam de acordo com as espécies (Afonso & Alves-Pires, 2008). As fêmeas realizam as refeições sanguíneas de acordo com as suas preferências tróficas, embora haja espécies com grande plasticidade trófica como é o caso de *P. perniciosus* e *Lutzomyia longipalpis*. Normalmente, as refeições sanguíneas ocorrem 24 horas após a eclosão das fêmeas. Contudo, laboratorialmente, verificou-se que várias espécies do género *Lutzomyia* alimentavam-se, preferencialmente, nos seus hospedeiros vertebrados, 48 horas após a eclosão. Segundo Brazil & Brazil (2003), este período, mais alargado, poderá estar relacionado com a maturação das glândulas salivares e a quitinização das peças bucais de algumas espécies flebotomínicas.

Os adultos têm como locais de repouso, e postura, vários tipos de biótopos, nomeadamente tocas de roedores, habitações humanas, caves, buracos e fendas nas paredes e/ou muros, grutas, termiteiras, galinheiros, coelheiras, estábulos, lixeiras entre outros (Fig. 11). Nestes locais, na suspeita da existência ou na monitorização/vigilância de flebotomíneos, devem ser colocadas armadilhas e/ou papéis impregnados com óleo de rícino, ou outros, para capturas e estudos no terreno, numa determinada região endémica, ou eventualmente endémica (Afonso & Alves-Pires, 2008).

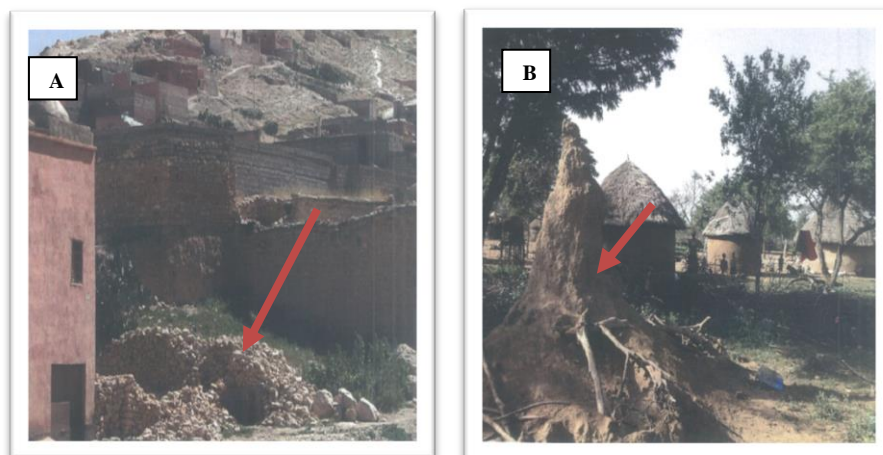


Fig. 11 - Biótipos utilizados por flebotomíneos para repouso (adultos), postura (fêmeas), e desenvolvimento larvar e pupal: **A** - Buracos em muros, Marrocos; **B** - Termiteiras, onde se pode encontrar *Phlebotomus martini*, junto a habitações humanas (ex. Sudão, Etiópia, Uganda e Quênia) (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

### 1.7 Espécies flebotomínicas conhecidas em Portugal: aspetos históricos, bioecológicos e vetoriais

Até à presente data, em Portugal, foram assinalados dois géneros flebotomínicos (*Phlebotomus* e *Sergentomyia*), quatro subgéneros (*Phlebotomus*, *Larroussius*, *Paraphlebotomus* e *Sergentomyia*) e cinco espécies (Quadro 3).

Quadro 3 Géneros, subgéneros e espécies flebotomínicas assinalados em Portugal

#### Género *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840)

*Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* (Scopoli, 1786)

*Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911

*Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

*Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

#### Género *Sergentomyia* (França & Parrot, 1920)

*Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

(Adaptado Afonso & Alves-Pires, 2008)

O estudo dos flebótomos, no País, teve início com o Doutor Carlos França, em 1912, onde assinalou *Phlebotomus papatasi*, durante um surto de febre de papatacci. Posteriormente, o mesmo Investigador assinalou, pela primeira vez, *Phlebotomus perniciosus*, a que chamou *P. lusitanicus*, e ainda a espécie *P. sergenti* (França, 1913; 1918; Afonso *et al.*, 2007a). Lamentavelmente, dada a morte prematura do Investigador Carlos França (Afonso *et al.*, 2007a), os estudos sobre estes insetos só recomeçaram após 30 anos, onde foram assinaladas, pela primeira vez, as espécies *P. ariasi* e *Sergentomyia minuta*, na região centro do País, pelos Investigadores Meira & Ferreira (1944), Ferreira & Ferreira (1944), Ferreira (1945), Fraga de Azevedo (1946) e Fraga de Azevedo & Teixeira (1946) que, entre outros aspetos, estudaram a distribuição, a fenologia, a ecologia das espécies capturadas e as preferências hemáticas, através de técnicas da reação das precipitinas e morfologia dos glóbulos vermelhos. As formas metacíclicas de leishmanias foram observadas no aparelho digestivo das fêmeas, mas não foi possível, à data, realizar a cultura dos protozoários.

Quanto ao norte e sul do País, e já nos anos cinquenta do século XX, o Investigador Rés (1957), assinalou a presença de flebotomíneos nas Bacias dos rios Douro e Guadiana. Cerca de 20 anos após os estudos acima mencionados, o Investigador Carlos Alves Pires, com o apoio do Professor Doutor Pedro Abranches (Abranches & Pires, 1980), ambos do IHMT, reiniciou os estudos dos flebótomos de Portugal, de norte a sul, e ainda da Ilha da Madeira e Selvagens, tendo realizado, posteriormente, trabalhos, neste âmbito, durante mais de trinta anos, quer com Investigadores nacionais, como por exemplo as Professoras Doutoradas Lenea Campino, Gabriela Santos Gomes, Sofia Cortes, Maria Odete Afonso e Carla Maia do IHMT, quer internacionais (Pires, 1979; 1984; 1985; 2000; Pires *et al.*, 1997; Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Alves-Pires & Capela, 1996; Alves-Pires *et al.*, 1991, 1992, 1997, 2001, 2004; 2008; Semião-Santos *et al.*, 1995; Afonso *et al.*, 2005; 2007a,b, Calheiros *et al.*, 2006; Campino *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2007; Afonso & Alves-Pires, 2008; Branco *et al.*, 2013; Ferrolho *et al.*, 2015; Schrey *et al.*, 1989; Franco *et al.*, 2010; 2011; Depaquit *et al.*, 2015).

Há ainda a salientar que o referido Investigador, demonstrou, definitivamente, que *P. perniciosus* e *P. ariasi*, capturados no terreno, são, em Portugal, comprovadamente vetores de *Leishmania infantum*. Assim, foram isoladas formas

metacíclicas de *Leishmania* a partir da válvula estemodeal, de ambas as espécies, seguida de cultura dos parasitas, no IHMT, com a colaboração da Professora Doutora Lenea Campino, e a identificação da espécie de *Leishmania*. Os zimodemes foram determinados em Montpellier, França (Centro de referência). O zimodeme MON-1 foi isolado das duas espécies do subgénero *Larroussius* e o MON-24 foi isolado, pela primeira vez na Europa, a partir de fêmeas de *P. ariasi* (Alto Douro) (Pires, 1984; Alves-Pires *et al.*, 1991; 2001).

Mais recentemente, e com a aplicação de técnicas moleculares, as Professoras Carla Maia, Lenea Campino e Maria Odete Afonso têm determinado as taxas de infeção por *Leishmania* sp. e as refeições sanguíneas de flebótomos capturados no terreno, particularmente na Região Algarvia (Sotavento e Barlavento) (Maia *et al.*, 2009; 2011; 2013; 2015; Campino *et al.*, 2013). Nos últimos anos, vários estudos flebotómicos, em diferentes distritos do País, têm sido realizados no decorrer de Teses de Mestrado do IHMT, como Mendonça (2011), Branco (2011), Miguel (2017) e Gouveia (2017), assim como a realização de trabalhos práticos de Alunos de Doutoramento (Ferrolho *et al.*, 2015), orientados pelas Professoras Maria Odete Afonso e Carla Maia, IHMT, UNL.

No que diz respeito à distribuição das espécies flebotómicas, em Portugal, tendo em conta o perfil bioclimático, verifica-se, de acordo com Rioux, 1986, *vide* Afonso, 2015, e com os estudos mencionados anteriormente, que *P. perniciosus* tem uma ampla distribuição de norte a sul do País, uma vez que se desenvolve em regiões húmidas, subhúmidas, semiáridas e áridas. No entanto, no sul, nomeadamente na Região Algarvia é a espécie dominante (Alves-Pires *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2013).

Em Trás-os-Montes e Alto Douro, ainda que *P. perniciosus* e *P. ariasi* tenham sido capturados infetados e infetantes com *L. infantum*, *P. ariasi*, nesta Região quente e húmida, é a espécie dominante, o que está de acordo com o seu perfil bioclimático. Em 2001, no concelho de Alijó, no último estudo realizado nesta Região, onde a leishmaniose humana e canina é endémica, capturaram-se 4828 flebotómicos, dos quais 73,1% (3530/4828) *P. ariasi*, 19% (917/4828) *P. perniciosus* e 7,9% (381/4828) *Sergentomyia minuta* (Afonso *et al.*, 2007b).

De acordo com Franco *et al.* (2010), *P. ariasi*, incluindo exemplares capturados na Arrábida, apresentam, uma diversidade intraespecífica elevada, com 45 haplótipos, diferentes entre si, por um a 26 bases, e são distribuídos por duas linhagens

mitocondriais: uma limitada geograficamente à Argélia e outra dispersa por diversas localidades e regiões de outros quatro países. A linhagem Europeia/Marrocos, à qual pertence *P. ariasi* de Portugal, é caracterizada pela grande diversidade de haplótipos (44). Este facto pode ser um dos fatores responsáveis pela heterogeneidade epidemiológica dos focos de leishmaniose onde esta espécie é vetora.

Na Região centro do País, como no caso do Concelho de Torres Novas, ainda que *P. ariasi* tenha sido a espécie capturada infetada por *L. infantum*, no que diz respeito à abundância relativa, a referida espécie flebotomínica foi menos abundante que *P. perniciosus*. Em relação à abundância relativa das quatro espécies capturadas em 2010, num total de 1262 exemplares, e por ordem decrescente, *P. perniciosus* foi a mais abundante (73,69 %), seguida de *S. minuta* (11,57%), *P. ariasi* (8,16%) e *P. sergenti* (6,58%) (Branco, 2013). Na Região urbana de Lisboa (Alcântara), durante uma prospeção flebotomínica, realizada em 2015, na época de atividade sazonal, em que se capturaram 459 exemplares, *P. perniciosus* foi igualmente a espécie mais abundante (51,179%), seguida *P. ariasi* (32,87%), *P. sergenti* (14,94%) e *S. minuta* (0,4%) (Gouveia, 2017).

Em relação à espécie *P. sergenti*, que prefere regiões quentes, áridas e semiáridas, num estudo realizado em 2002 e 2003, na Arrábida, confirmou-se a colonização desta espécie que, até aquela data, era considerada apenas uma presença esporádica (Afonso *et al.*, 2005). Também em Coimbra, em 2008, e pela primeira vez, confirmou-se a colonização de referida espécie (Pereira *et al.*, 2010). No Alentejo, no distrito de Évora, em 1992, 79 biótopos foram prospetados e capturaram-se 159 flebotomíneos, dos quais a espécie mais abundante foi *P. sergenti* (42,1%), seguida de *P. perniciosus* (36,5%), *S. minuta* (12%) e *P. ariasi* (9,4%) (Semião-Santos *et al.*, 1995). Contudo, também em Évora, *P. papatasi* foi capturado numa lixeira por Alves-Pires (2000). É de realçar que *P. papatasi*, espécie com preferência por climas áridos e hiperáridos, foi igualmente capturada no Algarve, num estudo realizado entre 1993 e 1996, e em que a abundância relativa, em função dos 3093 exemplares capturados, foi de 0,03%, sendo *P. perniciosus* a espécie mais abundante (51,50%) das cinco capturadas (Alves Pires *et al.*, 2008).

As abundâncias relativas das espécies flebotomínicas capturadas em diferentes distritos de Portugal continental, estão apresentadas na figura 12, em que são reportados dados dos estudos flebotomínicos mais recentes.

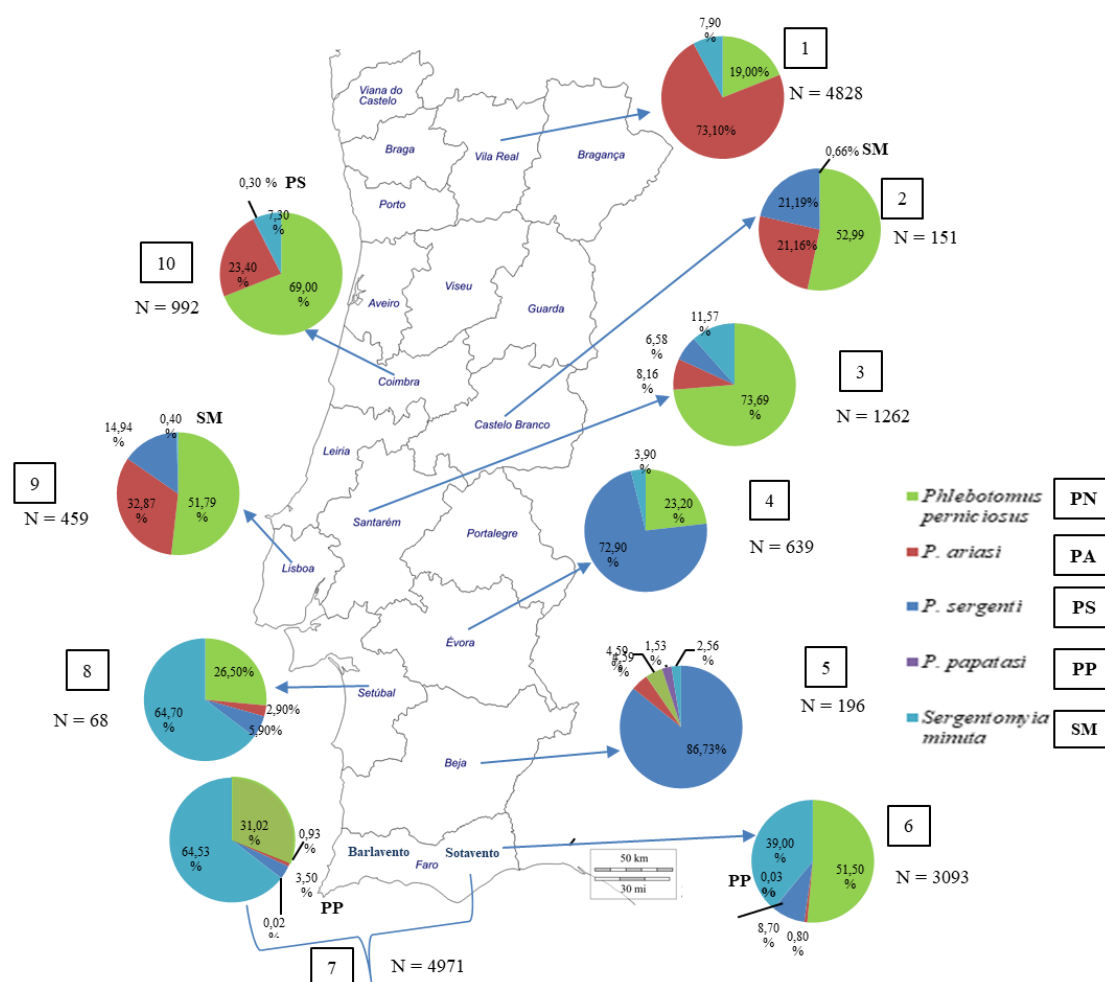


Fig. 12 - Número total (N) e Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas em distritos de Portugal, estando numerados, de 1 a 10, os estudos mais recentemente realizados: 1 - Afonso et al., 2007b; 2- Vilela et al., 2016a; b; 3- Branco, 2011; 4- Alves Pires et al., 2004; 5- Maia et al., 2010<sup>a</sup>; 6- Alves-Pires et al., 2008; 7- Maia et al., 2015; 8- Miguel, 2016; 9- Gouveia, 2016; 10- Pereira et al., 2008

### 1.8 Espécies flebotomínicas conhecidas no Brasil: aspetos históricos, bioecológicos e vetoriais

No Brasil, a primeira referência a flebotomíneos foi realizada por Lutz e Neiva, que, em 1912, descreveram *Lutzomyia longipalpis*, a espécie mais importante como

vetora de *Leishmania infantum* nas Américas. O Investigador Evandro Chagas, após uma expedição à Amazónia, em 1912-1913, coordenada pelo Doutor Oswaldo Cruz, e em que se verificou um elevado número de trabalhadores “seringueiros” com grandes ulcerações nas fossas nasais e nasofaringe, foi o grande impulsionador dos estudos flebotomínicos. Apesar dos flebótomos já serem indiciados como os transmissores da doença (leishmaniose mucocutânea), não foram, à data, encontrados onde havia o maior índice de ocorrência desse tipo de patologia, nomeadamente em Rio Acre (Chagas, 1936).

Em 1927, o Investigador Henrique Aragão confirmou a participação dos flebotomíneos na transmissão da leishmaniose no Novo Mundo, dada a constante presença destes insetos nos focos de leishmaniose na Cidade do Rio de Janeiro, e a identificação das formas infetantes de leishmanias no aparelho digestivo dos mesmos (Aragão, 1927). Assim, no Brasil, região altamente endémica de leishmanioses humanas, desde a visceral à mucocutânea, os estudos flebotomínicos estiveram sempre associados a estas entidades nosológicas (Rangel & Lainson, 2003).

O estudo da leishmaniose visceral foi iniciado pelo Investigador Henrique Penna que diagnosticou, laboratorialmente, a doença, pela primeira vez, em 1934, ao analisar fragmentos de fígado colhidos num estudo sobre a febre amarela. Em 1936, Evandro Chagas, filho de Carlos Chagas, coordenou a primeira Comissão sobre a leishmaniose visceral, organizada pelo Instituto Oswaldo Cruz. Lamentavelmente, o Investigador faleceu num acidente aéreo, em 1940, o que tornou impossível que os seus colaboradores recuperassem os trabalhos já iniciados. Devido a este facto, os estudos sobre as leishmanioses, e os seus vetores, abrandaram temporariamente.

Em 1953, dado o crescente número de casos de leishmaniose visceral, registados no nordeste Brasileiro, particularmente em Sobral, Estado do Ceará, um grupo de Investigadores, entre os quais se incluíam Leônidas Deane e a Maria José von Paumgarten, posteriormente conhecidos, pelos Cientistas que se dedicam a esta temática, pelo “Casal Deane”, mudaram-se para a região, de forma a aprofundar os conhecimentos sobre a doença e os vetores. Durante estes estudos, em 1956, foram identificadas formas promastigotas de *L. infantum* em flebótomos da espécie *Lu. longipalpis* capturados em habitações nas quais, pelo menos, um dos seus habitantes tinha leishmaniose visceral. Assim, a espécie *Lu. longipalpis* foi incriminada como a

responsável pela transmissão da doença/agente patogénico. A procura incessante pelo mecanismo de transmissão da doença levou a que Leonidas Deane inoculasse, voluntariamente, o parasita no seu braço. No Estado do Pará, no Nordeste, em 1977, Laison e colaboradores observaram uma taxa de infeção dos vetores entre 7 a 14%, o que corresponde a uma elevada infeção flebotomínica (Laison *et al.*, 1977).

Presentemente, no País, cerca de 20 espécies flebotomínicas estão relacionadas com a transmissão das leishmanioses a seres humanos (Pimenta *et al.*, 2003; Rangel & Lainson, 2003). A leishmaniose visceral é transmitida essencialmente pela espécie *Lu. longipalpis*, enquanto a leishmaniose cutânea está associada a uma panóplia de espécies vetoradas, com forte tendência antropofílica, que variam de acordo com a região geográfica e hospedeiros vertebrados disponíveis (Fig. 13) (Costa, *et al.*, 2007; Brazil & Brazil, 2014).

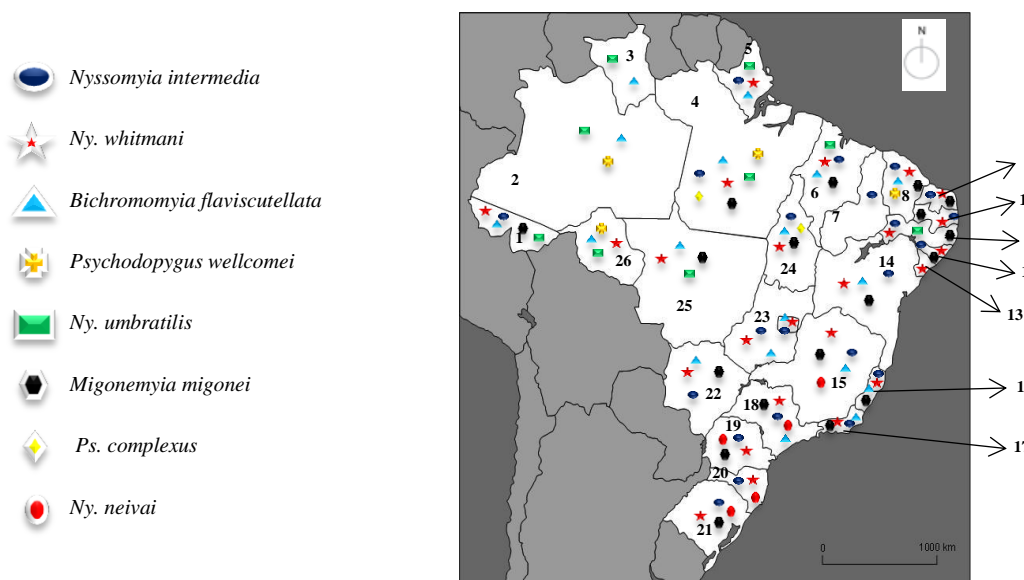


Fig.13 - Distribuição, conhecida, das principais espécies flebotomínicas, vetoradas da leishmaniose cutânea, no Brasil, por Estado. Manual da Secretaria de Vigilância da Saúde - Ministério da Saúde, 2010. 1- Acre; 2- Amazonas; 3- Roraima; 4- Pará; 5- Amapá; 6- Maranhão; 7- Piauí; 8- Ceará; 9- Rio Grande do Norte; 10- Paraíba; 11- Pernambuco; 12- Alagoas; 13- Sergipe; 14- Bahia; 15- Minas Gerais; 16- Espírito Santo; 17- Rio de Janeiro; 18- São Paulo; 19-Paraná; 20- Sta. Catarina; 21- Rio Grande do Sul; 22- Mato Grosso do Sul; 23- Goiana; 24-Tocantins; 25- Mato Grosso; 26- Rondônia

A espécie *Lu. longipalpis* tem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todas as cinco regiões geográficas brasileiras: Nordeste, Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, e só não foi registada em dois estados do Brasil: Amazonas e Santa

Catarina (Afonso, 2013; Vilela *et al.*, 2014) (Fig.14). A capacidade de se alimentar em animais domésticos e sinantrópicos (Fig.15), assim como a sua notável antropofilia, favorece a adaptação a diversos ambientes periurbanos e urbanos.

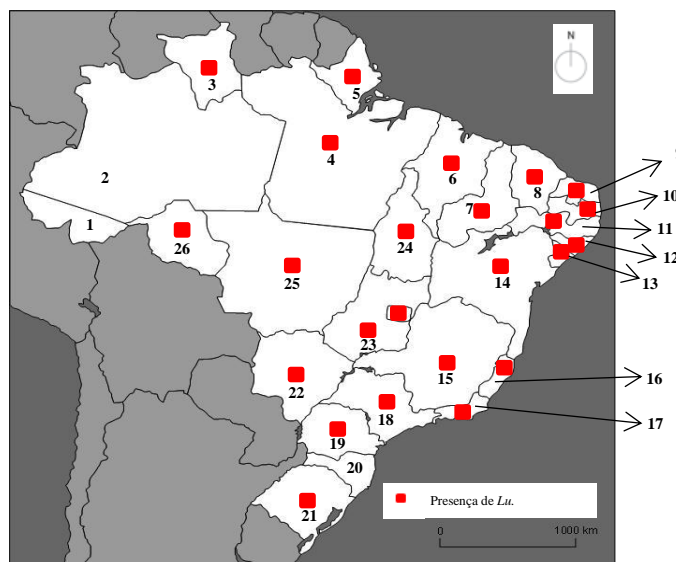


Fig. 14 - Distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* em diferentes Estados do Brasil. 1- Acre; 2- Amazonas; 3- Roraima; 4- Pará; 5- Amapá; 6- Maranhão; 7- Piauí; 8- Ceará; 9- Rio Grande do Norte; 10- Paraíba; 11- Pernambuco; 12- Alagoas; 13- Sergipe; 14- Baía; 15- Minas Gerais; 16- Espírito Santo; 17- Rio de Janeiro; 18- São Paulo; 19- Paraná; 20- Sta. Catarina; 21- Rio Grande do Sul; 22- Mato Grosso do Sul; 23- Goiana; 24- Tocantins; 25- Mato Grosso; 26- Rondônia (Adaptado de Manual da Secretaria de Vigilância da Saúde - Ministério da Saúde, 2010).

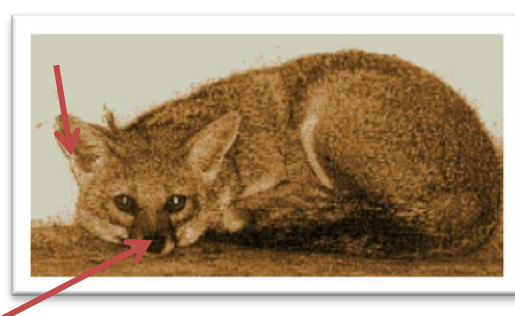


Fig. 15 - No Brasil, a raposa da espécie *Lycalopex veulus* é um reservatório de *L. infantum*. As setas indicam os locais de maior probabilidade de picada por flebotomíneos (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

*Lu cruzi* é uma espécie suspeita de ser a responsável pelos casos de leishmaniose visceral reportados no Estado de Mato Grosso do Sul, devido ao número significativo de exemplares capturados infetados com *L. infantum*. Segundo Lainson (2010), uma vez

que as fêmeas desta espécie são morfologicamente idênticas às de *Lu. longipalpis*, e somente a presença de exemplares machos permite fazer a diferenciação entre ambas, como não foram capturados exemplares machos de *Lu. longipalpis*, na referida região, as fêmeas capturadas foram consideradas *Lu. cruzi*.

O mais importante vetor de leishmaniose cutânea, por *L. braziliensis*, é a espécie *Nyssomyia withmani*, assinalada em todos os Estados do Brasil, com exceção de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É também transmissora de *L. shawi* e *L. guyanensis* em florestas primárias, no norte do país, como no Estado do Pará, onde o ciclo ocorre entre animais silvestres (Souza *et al.*, 2017; Costa, *et al.*, 2018;). Esta espécie apresenta, igualmente, hábitos alimentares antropofílicos, exceto nas áreas onde ocorre leishmaniose cutânea por *L. shawi*, onde se verifica pouca atratividade por seres humanos (Lainson *et al.*, 1989). Assim, considera-se que o habitat natural desta espécie são regiões silváticas e matas primárias (Fig. 16).



Fig. 16 - Introdução humana em biótopos silvestres, com adaptação de algumas espécies flebotomínicas aos ambientes humanos, Guatemala (adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

Contudo, a grande capacidade de se adaptar a novos ambientes, nomeadamente a diferentes tipos de vegetação, levou a que a espécie se expandisse, chegando a ser detetada nos mais variados biótopos peridomésticos (Rangel & Lainson, 2009). Suspeita-se, ainda, que esta espécie, conjuntamente com *Lu. intermedia*, partilhe a transmissão de *L. braziliensis* no Estado do Rio de Janeiro (Souza *et al.*, 2002).

No Estado do Rio de Janeiro, *Nyssomyia intermedia* é a espécie vetora de leishmaniose cutânea, tendo já sido comprovada a sua infecção natural, e laboratorial, por *L. braziliensis* (Rangel *et al.*, 1984; 1992; Pita-Pereira *et al.*, 2005). É uma espécie antropofílica, predomina em ambientes modificados pelos seres humanos, em áreas peridomésticas, mas pode alimentar-se em cães, galinhas e pequenos roedores. No Rio de Janeiro é mais abundante nos meses mais frios, nomeadamente junho, julho e agosto (Gouveia, *et al.*, 2012).

A principal espécie vetora de *L. guyanensis* é *Nyssomyia umbratilis* e ocorre maioritariamente na região Amazônica. É uma espécie típica de ambientes silvestres, ocupando a copa das árvores e alimenta-se preferencialmente em preguiças (*Bradypus Variegatus*) (Christensen *et al.*, 1982; Ready *et al.*, 1986). No início do século XX, esta espécie foi identificada no Estado de Pernambuco, o que suscitou alguma surpresa entre os Investigadores dada a considerável distância entre este Estado e a região amazônica (Balbino *et al.*, 2001).

*Migonemyia migonei* está amplamente distribuída pelo País e pode ser encontrada em biótopos domésticos e peridomésticos, dada a sua adaptação a ambientes modificados pelo ser humano, e alimenta-se preferencialmente em cães domésticos. No Estado do Rio de Janeiro, *Mi. migonei* foi associada a casos autóctones de leishmaniose visceral numa região onde não tinha sido assinalado espécimes de *Lu. longipalpis* (Souza *et al.*, 2003). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que *Mi. migonei* permite o desenvolvimento intravetorial de *L. infantum*, tendo sido registado, pela primeira vez, a sua infecção natural na região norte do Estado de Pernambuco, onde *Lu. longipalpis* apresenta densidades baixas (Carvalho *et al.*, 2010).

## **1.9 Desenvolvimento intravetorial de *Leishmania* spp.**

As leishmanias são parasitas digenéticos, ou seja, apresentam duas formas morfológicas ao longo do seu ciclo de vida, a forma flagelada extracelular, presente no hospedeiro invertebrado (amastigotas procíclicas), e a forma sem flagelo, intracelular, que se encontra no hospedeiro vertebrado infetado (formas amastigotas). Para além das formas, ao longo do ciclo de vida, as leishmanias adquirem diferentes capacidades motoras, expressam distintas moléculas de superfície e apresentam propriedades

bioquímicas específicas. Todas estas transformações são consideradas adaptações aos diferentes micro-habitats e barreiras bioquímicas, que os parasitas têm que ultrapassar, nomeadamente quando se encontram no aparelho digestivo do vetor (Santos *et al.*, 1998; Dvorak, 2018). Esta capacidade de sobrevivência e multiplicação das diferentes espécies de leishmanias é um dos principais fatores condicionantes da competência vetorial de várias espécies flebotomínicas.

O ciclo de vida, no vetor, inicia-se quando um flebotomíneo fêmea efetua uma refeição sanguínea infetada e ingere formas amastigotas presentes num hospedeiro vertebrado, previamente infetado, como o cão doméstico/silvático, a raposa, diferentes roedores e outros vertebrados. Posteriormente, caso seja suscetível à espécie de leishmania ingerida, pode transmitir leishmaniose ao ser humano e/ou a outros animais (Fig. 17).

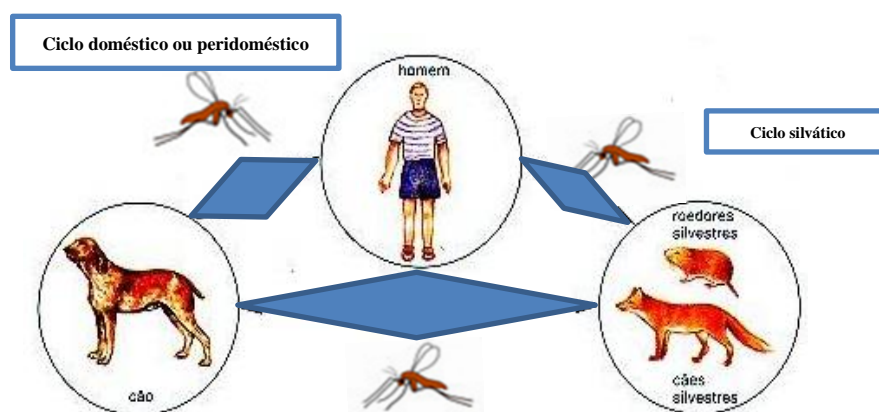


Fig. 17 - Ciclos de transmissão, flebotomíneos vetores, reservatórios e hospedeiro acidental, do protozoário *Leishmania* spp. Adaptado de: <http://blogs.diariodonordeste.com.br/bemestarpet/geral/ciclo-de-palestras-debate-liberacao-do-tratamento-da-leishmaniose-visceral-canina/> (Acedido a 6 de agosto de 2018)

No vetor, as formas amastigotas ingeridas, das espécies de *Leishmania* que conseguem sobreviver, inclusivamente à formação da membrana peritrófica, transformam-se em promastigotas (Dvorak *et al.*, 2018). Com o avançar da digestão, entre o segundo e o quinto dia, os promastigotas sofrem várias divisões e transformam-se em formas de maiores dimensões, as nectomonas, ao mesmo tempo que a membrana peritrófica começa a desintegrar-se. Estas formas, nectomonas, multiplicam-se rapidamente e começam a migrar para a parte anterior do intestino médio onde se fixam

às microvilosidades do epitélio, através do flagelo. Esta ligação só é possível dada a complementaridade que existe entre as moléculas de lipofosfoglicanos (LPG), presentes nas membranas de superfície dos promastigotas, e os seus recetores nas células epiteliais do intestino médio do vetor. A estrutura molecular do LPG apresenta polimorfismos intra e interespecíficos que influenciam a competência vetorial das espécies. Existem espécies flebotomínicas que, para além da combinação acima descrita, parecem usar outro tipo de moléculas facilitadoras da fixação (Kamhawi, 2002; Myskova, *et al.*, 2007). Do mesmo modo que a secreção de LPG é essencial para a fixação dos protozoários no intestino do vetor, também tem que existir a capacidade de perda da ligação para que as formas metacíclicas migrem para a região mais anterior (Sacks *et al.*, 1985).

As nectomonas colonizam diferentes regiões do intestino. No entanto, a sua distribuição é realizada de acordo com as preferências de cada subgénero do parasita. As espécies do subgénero *Viannia* têm uma preferência pelo intestino posterior, contrariamente ao subgénero *Leishmania* que prefere o intestino médio e anterior. Esta diferença levou a que Lainson & Shaw (1987) separassem as espécies do género *Leishmania* em três categorias: suprapilária, peripilária e hipopilária, sendo que a grande maioria de espécies de *Leishmania*, as que causam doenças em humanos, são suprapilárias, isto é, o seu desenvolvimento é restrito à porção do aparelho digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominal e torácica do intestino médio. Os parasitas com comportamento peripilárico pertencem ao subgénero *Viannia*, encontrados exclusivamente no Novo Mundo (Lainson & Shaw, 1987). O desenvolvimento do tipo hipopilárico é restrito, desenvolvendo-se unicamente no género *Sauroleishmania* (Bates, 2007).

Entre as nectomonas e as formas metacíclicas infetantes, desenvolvem-se as formas transitórias denominadas haptomonas. As haptomonas são formas específicas que se posicionam na região da válvula estemodeal e são responsáveis pela produção de um gel denominado *promastigote secretory gel* (PSG). Este gel, ao depositar-se na válvula estemodeal, na região mais anterior do aparelho digestivo, provoca a disfunção da mesma, impedindo o correto bombeamento do sangue que a fêmea pretende ingerir e estimula a regurgitação das formas metacíclicas infetantes quando a fêmea se encontra já infetante. Este facto obriga a um maior número de picadas por parte da fêmea, na

tentativa de se alimentar e, por consequência, a um aumento da transmissão vetorial (Kamhawi, 2002; Bates, 2007).

Recentemente, vários estudos têm vindo a ser realizados com o objetivo de melhor compreender a influência de uma segunda refeição sanguínea, na epidemiologia da transmissão das leishmanioses. Sobre esta matéria, em 1928, Shortt & Swaminath afirmaram que uma segunda refeição não tinha influência sobre a população de leishmanias no intestino do vetor e, em 1964, Adler afirmou que a taxa de infecção, nestas circunstâncias, não variava. Mais tarde, Nieves & Pimenta (2002) descreveram a influência das fontes sanguíneas no desenvolvimento de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* na espécie vetora *Lu. migonei*. Neste estudo, verificou-se, para ambas as espécies de *Leishmania*, que a população de parasitas aumentava, quando a fonte sanguínea (não infetante) era de roedores silváticos, seguida de gambás, seres humanos e cavalos. Verificaram ainda, que o número intravetorial de parasitas diminuía quando a segunda refeição sanguínea se realizava em suínos. O interesse sobre este assunto pelo Investigador Pimenta manteve-se, o que o levou a realizar um estudo sobre a presença de animais domésticos, como fontes de alimentação disponíveis, e a transmissão de *L. braziliensis* por *Nissomyia intermedia*. Assim, apesar da quantidade de sangue, ingerida na segunda refeição, tenha sido semelhante à primeira, observou-se que o padrão da infecção vetorial alterava-se, de acordo com a fonte de alimentação, sendo que um maior número de parasitas se observava em flebotomíneos alimentados em burros e cavalos. Pelo contrário, a realimentação em ovelhas e porcos levou a que a taxa de infecção diminuísse (Miranda *et al.*, 2008).

Recentemente, Serafim e colaboradores (2018) verificaram, experimentalmente, que uma segunda refeição sanguínea sem leishmanias, ou seja, não infetada, em fêmeas que fizeram, anteriormente, uma refeição sanguínea infetante, promove a diferenciação de novas formas replicativas denominadas retroleptomonas, que amplificam e contribuem para a metaciclogénese (Fig. 18).

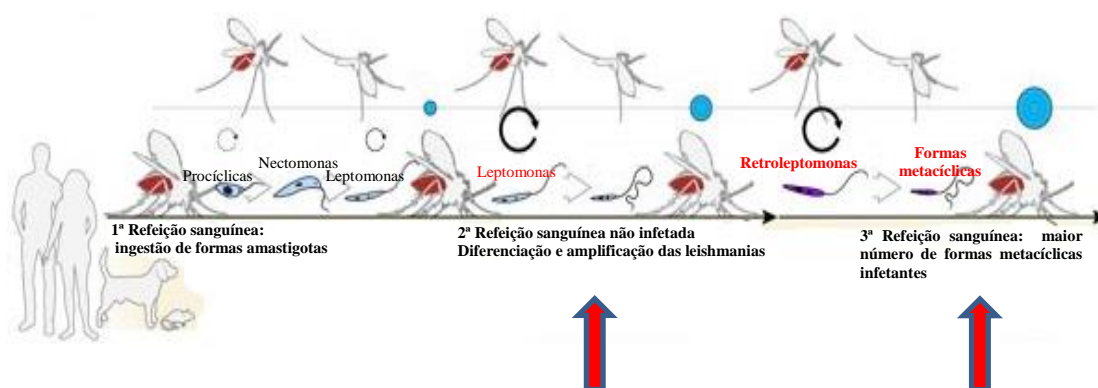


Fig. 18 - Aumento da probabilidade de transmissão de *Leishmania* na sequência de uma segunda refeição sanguínea, não infetada, de uma espécie flebotomínica vetora, antes da existência de formas metacíclicas. As setas circulares, a negro, indicam a multiplicação de leptomonas e de retroleptomonas. Os círculos azuis indicam o aumento das formas haptomonas nos três eventuais cenários (Adaptado de Serafim *et al.*, 2018)

Estes resultados demonstram a importância não só da presença de diferentes hospedeiros vertebrados, para a continuidade do ciclo de transmissão, mas também a relevância de uma segunda refeição sanguínea do vetor, na transmissão dos parasitas.

Também a saliva, inoculada pela fêmea, durante a picada no hospedeiro, tem um papel importante na transmissão de leishmanias. No momento da picada, a saliva apresenta substâncias quimiotáticas vasodilatadoras que facilitam a ingestão sanguínea, ao mesmo tempo que suprimem temporariamente a resposta imunitária do hospedeiro vertebrado. Em particular, na espécie *Lu. longipalpis* a saliva é constituída maioritariamente por um péptido vasodilatador, maxidilan, que inibe a ação dos macrófagos, para além de aumentar o fluxo sanguíneo.

Pelos resultados acima apresentados, poder-se-á referir que vários estudos têm sido desenvolvidos no âmbito da infeção e transmissão, mas os numerosos aspetos da inter-relação vetor-parasita-hospedeiro, tal como noutras doenças transmitidas por vetores, ainda requerem mais conhecimentos uma vez que estas relações são milenares e têm permitido a evolução e coevolução das mesmas. Para que, de algum modo, se possa mitigar estas premissas, estudos laboratoriais e no terreno terão que continuar a ser efetuados para se esclarecer, controlar e diminuir uma das mais graves zoonoses/antroponoses do Velho e Novo Mundo.

### 1.9.1 Mecanismo e tipo de transmissão

A transmissão vetorial das leishmanioses ocorre através de um mecanismo ativo, do tipo biológico, cíclico, evolutivo, multiplicativo, ou seja, o vetor infeta-se ao procurar ativamente o hospedeiro vertebrado onde realiza uma refeição sanguínea, que pode ser infetante, e é no interior do aparelho digestivo que ocorre a evolução e multiplicação das formas parasitárias de *Leishmania*. O vetor, uma vez infetado, permanece infetado e infetante ao longo da vida.

No Velho Mundo, como por exemplo nos países do sul da Europa, o cão doméstico é o reservatório mais comum de *Leishmania*, no que diz respeito à transmissão zoonótica de leishmaniose visceral, e o ser humano constitui um hospedeiro acidental. Contudo, o ser humano pode atuar como reservatório na transmissão antroponótica, ou seja, de pessoa a pessoa, como é o caso da leishmaniose cutânea, por *L. tropica*, em áreas onde o vetor *P. sergenti* apresenta densidades elevadas (Maroli *et al.*, 2013). Já na Índia, *P. argentipes* é vetor de *L. donovani* dando origem, no ser humano, às leishmanioses visceral, cutânea pós Kalazar e cutânea localizada. No mesmo país, *P. salehi*, vetor de *L. major*, origina, igualmente no ser humano, leishmaniose cutânea localizada e difusa. Nesta região, a transmissão de leishmaniose visceral ocorre, maioritariamente, em populações de fracos recursos económicos, em ambientes propícios ao desenvolvimento vetorial. Em África, como no Sudão, *P. dubosqui* e *P. papatasi* transmitem, ao ser humano, *L. major*, com a ocorrência de leishmanioses, cutânea localizada e difusa (Fig. 19).



Fig. 19 **A** - Na Índia, biótopo rico em matéria orgânica, junto de habitações humanas, propício à transmissão de leishmaniose; **B** - No Sudão, biótopo propício ao desenvolvimento do ciclo antroponótico de leishmaniose (Adaptado de Alvar, 2018)

Além da transmissão vetorial de leishmaniose, outros tipos de transmissão também ocorrem como a congênita, venérea, por transfusão sanguínea, através de transplantes e por partilha de seringas infetadas, estando todas elas descritas, na literatura, tanto no Velho como no Novo Mundo (Kilick-Kendrick 1999; Filho, *et al.*, 2005; Singh, 2006; Basset *et al.*, 2005). No sul da Europa, a transmissão por seringas infetadas assume uma grande importância epidemiológica devido aos utilizadores de drogas intravenosas, que são um grupo de risco de coinfeção leishmaniose/VIH (Desjeux & Alvar, 2003; Campino & Maia, 2010). Já no Novo Mundo, principalmente no Brasil, os utilizadores de drogas por via intravenosa não constituem um grupo de risco para a coinfeção leishmaniose/VIH (Rabello *et al.*, 2003).

Mais recentemente, uma vez que o cão é o principal reservatório de leishmaniose visceral, alguns estudos apontam para a eventual transmissão, entre cães, através da mordedura. Contudo, este tipo de transmissão, de cães infetados diretamente a humanos, até à data, nunca foi reportado (Naucke *et al.*, 2016).

### **1.10 Leishmanioses no Velho e no Novo Mundo: Portugal e Brasil**

No Velho Mundo, a leishmaniose visceral é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, nomeadamente *L. infantum*, na Bacia Mediterrânica e África Ocidental, e por *L. donovani* na Índia, China e África Oriental. Contudo, esta última espécie, antroponótica, foi recentemente introduzida no Chipre, dando origem a leishmaniose visceral e cutânea (Antoniou *et al.*, 2013). As espécies acima mencionadas são, na sua maioria, responsáveis pela manifestação clínica da doença sob a forma de leishmaniose visceral, ou Kala-azar, quando invadem as células do sistema fagocítico mononuclear, como o baço, fígado, medula e gânglios linfáticos. Na Bacia do Mediterrâneo, coexistem as espécies *Leishmania infantum*, *L. donovani*, *L. major* e *L. tropica*. (Iriso *et al.*, 2017a). *L. infantum* é a única espécie presente na Europa, e responsável em Portugal pelos casos de leishmaniose humana (visceral e cutânea) e canina. Contudo, na Grécia e Turquia também existe *L. tropica* (Campino 1998; Campino *et al.*, 2006; Antoniou *et al.*, 2013).

O primeiro caso de leishmaniose visceral, em Portugal, foi diagnosticado numa criança com nove anos de idade, em Lisboa, em 1910 e, um ano depois, foi registado, por

Álvares & Silva, o primeiro caso de leishmaniose canina. Em 1945, o Professor Doutor Fraga de Azevedo e colaboradores iniciaram os estudos sobre a leishmaniose em Portugal (Cardoso *et al.*, 2006) e, em 1948, a leishmaniose visceral humana tornou-se uma doença de declaração obrigatória. Segundo os dados da Direção Geral de Saúde (DGS), Portugal apresentava uma elevada incidência de leishmaniose visceral entre 1942 e 1951. Em 1970, apenas 20 casos foram notificados, data após a qual se registou um aumento progressivo até 1983, tendo sido notificados, nesse ano, 51 novos casos (DGS, 2016).

É de salientar, que durante o período de prospeção flebotomínica, realizado por Semião Santos, no Distrito de Évora, em 1991, três casos infantis de leishmaniose visceral foram registados no hospital central (Semião-Santos, *et al.*, 1995). De 2000 a 2007, a DGS notificou 133 casos (58 crianças e 75 adultos) dos quais, 68 pertenciam à Região Metropolitana de Lisboa. No entanto, durante quase o mesmo período (2000 a 2009), foram diagnosticados na Unidade de Leishmanioses do IHMT, 173 novos casos de leishmaniose visceral humana, 66 dos quais em indivíduos imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e 107 adultos imunodeprimidos (Campino *et al.*, 2006; Campino & Maia, 2010). Apesar da prevalência aparentemente baixa em Portugal, pouco se sabe sobre a prevalência de infetados assintomáticos, cujo conhecimento é importante, quer em termos clínicos, quer em termos epidemiológicos. Estima-se que por cada doente registado, existirão entre 30 a 100 casos assintomáticos (Dujardin *et al.*, 2008). Também a atribuição da designação de uma doença maioritariamente infantil, tem vindo a alterar-se, uma vez que se tem registado um maior número de casos em adultos, nomeadamente em coinfetados com VIH/SIDA (Campino & Maia, 2010). A forma cutânea por *L. infantum*, considerada benigna e de cura espontânea, contribui para que um grande número de casos seja subnotificado (Dujardin, *et al.*, 2008).

A manifestação da leishmaniose cutânea por *L. tropica*, como em Marrocos, surge através de lesões na superfície da pele, exposta às picadas de flebotomíneos, como a face, braços e mãos, formando nódulos que podem provocar cicatrizes desfigurantes e a despigmentação da pele (Dedet & Pratlong, 2003).

Em 2012, em Portugal verificou-se um caso não autóctone de leishmaniose cutânea, numa criança de seis anos, que tinha viajado para a Tunísia nos meses anteriores. A análise molecular realizada à pele de uma das lesões cutâneas, revelou DNA de *L. major* (Faleiro *et al.*, 2012).

No Norte de África, onde *L. major* e *L. tropica* são responsáveis por leishmaniose cutânea, *L. infantum* foi, igualmente, identificada em lesões cutâneas (Gramiccia *et al.*, 1991). Os diferentes tipos de manifestação clínica associados a infeções por *L. infantum*, estão relacionados com a resposta imunitária do hospedeiro. Indivíduos imunocomprometidos infetados por *L. infantum* podem apresentar lesões cutâneas, contrariamente aos doentes imunocompetentes que apresentam lesões viscerais (Campino, *et al.*, 1997; 2006).

Segundo o Observatório Nacional das Leishmanioses (OnLeish), criado em 2008, estima-se que em Portugal todos os anos sejam reportados entre 10 a 15 novos casos de leishmaniose humana o que levará a que a doença deixe de ser considerada rara (Campino & Maia, 2010).

Segundo a DGS, entre 2012 e 2015, a faixa etária mais afetada no que diz respeito ao número de casos notificados de leishmaniose visceral, foi a dos 35 aos 54 anos (18 casos), o que não está de acordo com as anteriores informações em que as crianças com idades inferiores a cinco tendiam a ser a camada populacional mais afetada. Este facto pode estar relacionado com os imunodeprimidos, por várias causas.

Segundo Campino *et al.* (2006), das estirpes de *L. infantum* isoladas em Portugal, e analisadas por tipagem isoenzimática, verificou-se que à semelhança do que se observa na restante Bacia Mediterrânica, MON-1 é o zimodeme mais frequente de norte a sul do País e o que está presente nas leishmanioses humana e canina. Já MON-24, MON-29 e MON-80 foram isolados a partir de seres humanos coinfectados com VIH/SIDA. Cardoso *et al.* (2002) descreveram um caso de leishmaniose canina, no Alto Douro, em que foi isolado MON-98. No que diz respeito aos flebotómios vetores, até à data, foram isolados os zimodemes MOM-1, em *P. perniciosus* capturado no Algarve (Alves-Pires *et al.*, 2001) e MON-24, em *P. ariasi* capturado no Alto Douro (Alves-Pires *et al.*, 1991).

No Novo Mundo a epidemiologia das leishmanioses é mais complexa. É considerada uma doença com uma grande diversidade de vetores e reservatórios, associada a diferentes padrões de transmissão e de formas clínicas. No Brasil, as leishmanioses fazem parte da lista das grandes endemias do Sistema Nacional de Informação de doenças de notificação obrigatória do Ministério da Saúde e, em 2015, este País, juntamente com a Etiópia, Índia, Quénia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, reportaram mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral que ocorreram em todo o

Mundo (Burza *et al.*, 2018). Tal como no Velho Mundo, o principal agente responsável pela leishmaniose visceral é *L. infantum*, introduzida, no Brasil, durante o período de colonização, portuguesa, através de cães infetados. Este parasita, durante um longo período de tempo foi designado por *L. chagasi* em memória dos seus descobridores e de forma a diferenciar-se de *L. infantum* do Velho Mundo e, posteriormente, por *L. chagasi infantum*. No entanto, robustos estudos moleculares, coadjuvados por infeções laboratoriais do vetor *Lu. longipalpis* por *L. infantum* do Velho Mundo, suportam a sinonímia. Presentemente, a maioria dos Investigadores já referem *L. infantum*, ou *L. infantum (chagasi)* (Momen & Cupollilo 2000; Akhoudi *et al.*, 2016; Maurício, 2018).

No Brasil, oito espécies de *Leishmania* são patogénicas para os seres humanos, sendo sete do subgénero *Viannia* (Fig. 20) e *L. infantum* do subgénero *Leishmania*. O subgénero *Viannia* está relacionado à leishmaniose cutânea (localizada/difusa/mucocutânea), sendo as espécies *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. brasiliensis* as responsáveis pela maioria dos casos, e o subgénero *Leishmania* a casos de leishmaniose visceral (mais raramente a leishmaniose cutânea localizada e difusa) (Shaw, 1993; Maroli *et al.*, 2013).

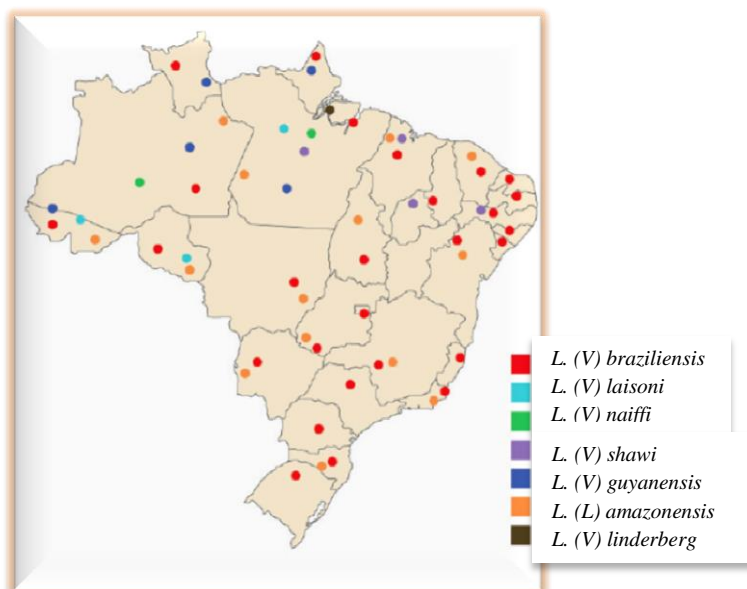


Fig. 20 - Distribuição de espécies de *Leishmania* (Subgénero *Viannia*) responsáveis pela manifestação de leishmanioses cutâneas nos diferentes Estados do Brasil (Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, Brasil)

No Novo Mundo, verificaram-se híbridos de *L. braziliensis* e *L. peruviana* e nos estudos realizados *in vitro*, os clones híbridos apresentaram fenótipos heterogéneos.

Laboratorialmente, os hamsters infetados com as estirpes híbridas, apresentaram maiores densidades de parasitas e recidivas agressivas numa fase avançada da infeção. Observou-se também, que os híbridos mostraram maior plasticidade e diversidade fenotípica que as espécies putativas parentais, com potenciais implicações eco-epidemiológicas, incluindo impacto no sucesso do controlo da doença (Cortes *et al.*, 2012b).

Inicialmente, a leishmaniose visceral parecia estar circunscrita a ambientes silvestres, atingindo apenas a população humana em ambientes rurais e nos estados mais a norte do Brasil. No entanto, com as profundas e rápidas modificações socioeconómicas que se deram no País, devido à industrialização na segunda metade do século XX, verificou-se uma alteração no padrão de transmissão da leishmaniose visceral. Atualmente, verifica-se que a epidemiologia da doença se alterou de uma zoonose rural para uma zoonose/antropozoonose periurbana e urbana, e cerca de 3000 casos são reportados anualmente. O número de casos confirmados da doença, nas cinco regiões do país, em 2014, e de acordo com o Ministério da Saúde, está representado no Quadro 4 (Rangel & Vilela, 2008; Marzochi, *et al.*, 2009; Vilela, *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2018).

Quadro 4 Número de casos reportados de leishmaniose visceral humana nas cinco Regiões administrativas do Brasil, em 2014, salientando-se o maior número no Nordeste

<b>Região</b>	<b>Norte</b>	<b>Nordeste</b>	<b>Centro</b>	<b>Sudeste</b>	<b>Sul</b>
Nº casos	404	2022	184	456	4

O primeiro registo de leishmaniose visceral, no País, deu-se em 1913 nos Estados do Norte e Nordeste, mantendo-se a doença circunscrita a estas regiões. No início da década de 80, do século XX, verificou-se um período de extrema seca, levando a que as populações procurassem melhores condições de vida nas grandes cidades, como o Rio de Janeiro. A ida de populações humanas de áreas endémicas, assim como os seus cães, para áreas em que havia vetores, levou à expansão geográfica da leishmaniose visceral nessas áreas (Marzochi *et al.*, 2009; Sangenis, *et al.*, 2014).

Presentemente, no Brasil, ainda se verificam regiões em que a leishmaniose visceral aparece pela primeira vez, como é o caso do Município de Volta Redonda,

situado no Estado do Rio de Janeiro, em que o primeiro caso reportado foi em 2014, e que se diagnosticou como sendo autóctone (Sangenis, *et al.*, 2014).

A leishmaniose cutânea tem uma ampla distribuição no Novo Mundo e, tal como a leishmaniose visceral, o Brasil é um dos países que regista, anualmente, maior número de casos devido à presença de espécies vetoras com fortes tendências antropofílicas e densidades elevadas. É uma doença conhecida desde 1884, e a sua expansão coincide com movimentos migratórios dos Estados do Nordeste para a Amazónia, aquando da exploração da borracha e, posteriormente, para os Estados localizados a sudeste, devido à expansão da cultura do café. Na década de 50 (século XX), registou-se um decréscimo no número de casos da doença, o que foi inicialmente associado à diminuição de áreas de desmatamento no sul do País. Contudo, tal facto, deveu-se ao uso de inseticidas, como o DDT, para controlo da malária e da doença de Chagas. Na década de 1970-80, verificou-se um aumento acentuado de casos, coincidentes com a instalação de uma rede hidroelétrica, que originou a deslocação, em massa, de populações da Amazónia para outras regiões. Assim, a leishmaniose cutânea está, muitas vezes, associada às atividades humanas em ambientes silváticos, e a grandes modificações ambientais como a desflorestação e a construção de grandes infraestruturas (Marzochi, *et al.*, 2014; Gradoni, 2018). Segundo o Ministério da Saúde, em 2016, o número de casos reportados superou os 8.000 (Quadro 5).

Quadro 5 - Número de casos reportados de leishmaniose cutânea nas cinco Regiões Administrativas do Brasil, em 2016 (N/A- não assinalados)

<b>Região</b>	<b>Norte</b>	<b>Nordeste</b>	<b>Centro</b>	<b>Sudeste</b>	<b>Sul</b>
Nº casos	5075	3166	N/A	1221	212

No Estado do Rio de Janeiro, a leishmaniose cutânea é conhecida desde o início do século XX, tendo o número de casos aumentado a partir da década de 80, em particular na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro. Em 2003, foi o principal problema de saúde pública com padrão de transmissão peri e intradomiciliar (Gouveia, 2008). Contudo, a grande maioria dos casos concentram-se em áreas próximas de matas.

Tanto no Velho como no Novo Mundo, a relação do cão doméstico com os seres humanos e a proximidade entre ambos, faz com que o cão seja considerado o principal

reservatório do parasita (*L. infantum*), e o responsável pela infecção em humanos. A leishmaniose canina adquire uma extrema importância para a medicina veterinária e humana, já que também os cães assintomáticos podem ser bons reservatórios, o que promove o risco de transmissão e a manutenção da doença (Campino & Maia, 2012; Dujardin *et al.*, 2008). Estima-se, que no sudoeste europeu, cerca de 2,5 milhões de cães estejam infetados, número que poderá aumentar dado o hábito que, presentemente, se verifica em adotar animais de áreas endêmicas e transportá-los para áreas não endêmicas, como por exemplo a Alemanha (Cortes *et al.*, 2012a). Um outro fator a considerar, para o aumento do número de cães infetados, e em particular em regiões onde os vetores não estão assinalados, poderá ser a transmissão por vias que não necessitem de um vetor como a transmissão vertical, sexual, e de cão para cão pela mordedura entre eles (Maia & Cardoso, 2015; Naucke & Lorentz, 2012).

A prevalência da leishmaniose canina em Portugal não é uniforme, mas estima-se que 6% dos cães estejam infetados, chegando algumas regiões a atingir uma seroprevalência superior a 15%, tal como pode ocorrer em países da Europa mediterrânica (Cardoso *et al.*, 2004; OnLeish, 2010, Franco *et al.*, 2011). Outros animais têm sido apontados como reservatórios, ou hospedeiros acidentais uma vez que já foram detetados infetados, por *L. infantum*, como é o caso do gato. Estes felinos são infetantes para os flebotomíneos podendo, então, atuar como reservatórios secundários, enquanto que os cães são considerados os reservatórios naturais, primários (Maia *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011; Pennisi *et al.*, 2015). Inclusivamente, na Turquia, foram detetados gatos abandonados infetados com *L. infantum* e *L. tropica* (Can *et al.*, 2016). Em Portugal, o cavalo (*Equus caballus*) e a raposa (*Vulpes*) foram encontrados infetados por *L. infantum*, sendo esta última considerada um reservatório silvático (Abranches, 1984; Rolão *et al.*, 2005). No que diz respeito a outros animais, também o urso (Garnham, 1965), o gambá (*Didelphis marsupialis*) e a preguiça (*Choloepus didactylus*) são considerados hospedeiros acidentais, ou reservatórios como no caso destes dois últimos. Mais recentemente, em Madrid, foi detetado o primeiro caso em primatas não humanos (orangotango, em jardim zoológico) (Miró *et al.*, 2018), assim como lebres infetadas em área urbana da cidade (Jiménez *et al.*, 2013).

Ao protozoário *Leishmania* sp. não lhe era reconhecida a capacidade de trocas genéticas, sendo a sua divisão considerada exclusivamente binária (Nolder *et al.*, 2007).

No entanto, verificou-se que, em condições de “stress”, as trocas genéticas poderão ser fundamentais para a sua sobrevivência e expansão (Ravel *et al.*, 2006; Volf, *et al.*, 2007; Cortes, 2012b), e que a proximidade genética não é condição fundamental para que tal aconteça (Mariconi, *et al.*, 2017).

Tanto no Velho como no Novo Mundo, já foi descrita a presença de híbridos de espécies de *Leishmania* em vários Países (Albuquerque, 2013). Em Portugal, foram descritos híbridos de espécies filogeneticamente distantes como *L. infantum/L. major*, patogênicas para humanos, que são transmitidas por diferentes vetores, e que foram isolados de um indivíduo imunocomprometido (Ravel *et al.*, 2006; Volf *et al.*, 2007; Moriconi, *et al.*, 2017). No Brasil, foram recentemente caracterizadas estirpes híbridas de *Leishmania guyanensis* e *L. shawi* isoladas de doentes com leishmaniose cutânea (Lima, 2016).

A hibridação pode, assim, permitir a adaptação dos parasitas a novos vetores, e/ou hospedeiros, e a um aumento da capacidade de dispersão e transmissão das leishmanioses. Este facto, poderá ter implicações na epidemiologia, e consequentemente no controlo da(s) doença(s).

### **1.11 Influência das alterações climáticas e ambientais nos vetores, e na epidemiologia das leishmanioses**

A distribuição mundial das leishmanioses é limitada pela existência de espécies flebotomínicas vetoras

, e/ou vetoras permissivas, ou seja, em que uma determinada espécie de *Leishmania* se desenvolve em mais do que uma espécie flebotomínica vetora, do agente patogénico *Leishmania* spp., dos hospedeiros vertebrados preferenciais, dos reservatórios e de outros aspetos bióticos e abióticos, condicionando esta parasitose, ainda negligenciada, às regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Antoniou *et al.*, 2013; Trájer *et al.*, 2013).

Contudo, segundo Ready (2010) e Medlock *et al.*, (2014), a presença de flebotomíneos vetores, nas regiões temperadas, é suficiente para ser considerada um fator de risco para a emergência de leishmanioses em regiões ainda não endémicas ou para o aumento da parasitose em áreas onde já se verifica a transmissão vetorial. As

alterações climáticas, decorrentes do aquecimento global, que dão origem ao aumento da temperatura média anual, poderão ter como consequência o aumento do período de atividade e densidade flebotômicas, o aumento do número de gerações anuais, e a diminuição do número de dias do ciclo extrínseco do parasita. O conjunto destes fatores pode determinar o aumento das leishmanioses, numa ou mais regiões do mesmo país, consoante a distribuição das espécies vetorais. Os referidos fatores, quer climáticos, quer ambientais, podem, ainda, conduzir à dispersão dos vetores e à consequente expansão da doença por áreas e/ou países anteriormente não afetados (Ashford, 2000; Dujardin 2006; OMS 2010; Poepl *et al.*, 2013; Alten *et al.*, 2016).

Alguns dos efeitos mencionados, como a expansão vetorial, já se verificam, por exemplo, no norte de Itália com casos de leishmaniose canina, e a presença de *P. perniciosus*, e casos autóctones de leishmaniose canina na Alemanha (Bogdan *et al.*, 2001; Ferroglio *et al.*, 2010; Naucke *et al.*, 2008; Maroli *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2017).

Relativamente a Portugal, tendo início, em 2002, os Projetos *Climate Change in Portugal - Scenarios, Impacts and Adaptation Measures* (SIAM I e SIAM II), realizaram-se modelos climáticos preditivos sobre *P. perniciosus* e o aumento da leishmaniose no País, tendo em conta dados de 30 anos de estudos vetoriais e bioecológicos (Casimiro & Calheiros, 2002; Calheiros *et al.*, 2006; Casimiro *et al.*, 2006). Prevê-se, assim, um aumento da temperatura média anual de 3,3°C até 2040 e 5,8 até 2090 e, por consequência, o aumento do número de meses, por ano, durante os quais os flebotómicos irão aumentar de densidade e capacidade de transmissão vetorial. Segundo Baptista *et al.* (2007), as regiões do nordeste de Portugal serão as mais propícias ao aumento de *P. ariasi* e a região Algarvia a mais propícia para o aumento de *P. perniciosus*. No País, vários projetos de investigação, nacionais e internacionais, como a Rede Europeia de Vigilância de Artrópodes Vetores para a Saúde Humana (VBORNET), Emerging diseases in a changing European environment (EDEN e EDENext), e o Programa Nacional Rede Vigilância de Vetores 2017 (REVIVE), têm surgido para conjugar as previsões climáticas e ambientais, nos próximos anos, tendo em vista as doenças transmitidas por vetores e, neste caso, as leishmanioses.

Vários estudos têm sido realizados e, por exemplo, Trájer e colaboradores (2013) realizaram um modelo preditivo da distribuição de espécies flebotômicas presentes na Europa até 2070, nomeadamente *P. ariasi*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P.*

*perniciosus*, *P. sergenti*, *P. similis* e *P. tobbi*. Na figura 21, está representada a distribuição atual das espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, na Europa, a distribuição prevista para o período compreendido entre 2011 a 2040 e, ainda, de 2041 a 2070.

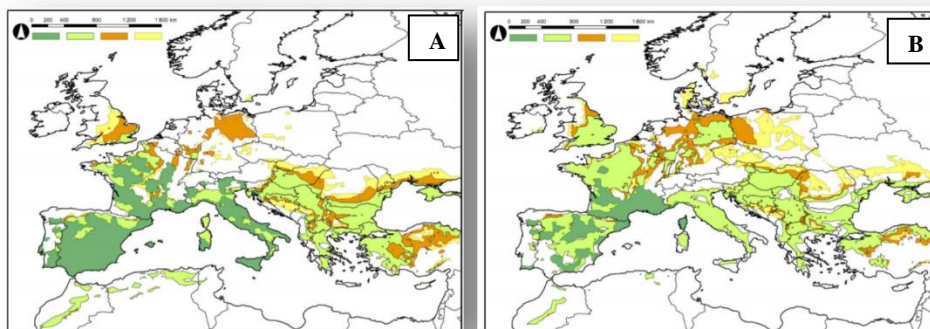


Fig. 21 **A**- mapa da Europa com a distribuição atual de *P. perniciosus* (a verde escuro), potencial distribuição modelada (a verde claro), potencial distribuição preditiva para o período de 2011-2040 (a laranja), e potencial distribuição preditiva para o período 2041-2070 (a amarelo); **B**- legenda idêntica, mas para a espécie *P. ariasi* (Adaptado de Trájer *et al.*, 2013)

O referido modelo mostra que as espécies comprovadamente vetoradas de leishmaniose, como *P. perniciosus* e *P. ariasi*, poderão expandir-se para latitudes correspondentes ao Reino Unido, Alemanha e Hungria, chegando *P. ariasi* a atingir, no período de 2041-2070, os países escandinavos, ou apresentar maior densidade nas regiões onde já se estabeleceram. Como esperado, devido ao perfil bioclimático destas duas espécies vetoradas, *P. perniciosus* terá densidades mais elevadas no sul/centro da Europa e *P. ariasi* terá uma maior expansão quer para norte, quer para leste, da Europa (Trájer *et al.*, 2013).

Com o aumento da temperatura média anual, a expansão de *P. ariasi* surge associada à expansão ou reemergência de leishmaniose canina, como aconteceu em várias regiões espanholas e, mais recentemente, em Andorra (Ballart *et al.*, 2012). A identificação de *P. ariasi* nesta região, localizada entre os 800 e 2.200 m, acima do nível do mar, mostra que a altitude poderá deixar de ser um fator limitativo na distribuição desta espécie. A expansão de *P. perniciosus*, presentemente, está mais associada à própria migração populacional para áreas vizinhas (Ferroglio *et al.*, 2010).

*P. perfiliewi* e *P. neglectus* distribuem-se por países da Europa do centro/leste, com temperaturas mais amenas do que as registadas no sul da Europa. São espécies comprovadamente vetoras de leishmaniose visceral pelo que se prevê que haja um maior risco de expansão da doença.

Assim, através dos diversos trabalhos já mencionados, verifica-se que, cada vez mais, existem regiões com um risco acrescido para a presença de flebotomíneos vetores ou propensas ao estabelecimento de populações flebotomínicas, como na Alemanha, Suíça e Áustria (Medlock *et al.*, 2014).

Já no que diz respeito ao Novo Mundo, nomeadamente no Brasil, por ser um País de dimensões continentais, as especificidades climáticas e ambientais, de cada região, condicionam, em grande escala, a distribuição das espécies vetoras de leishmanioses (Rangel *et al.*, 2018). Em 2017, Peterson e colaboradores, apresentaram um modelo preditivo da distribuição de leishmaniose visceral, com base nas alterações climáticas, mostrando que o género *Lutzomyia* poderá, num futuro próximo, instalar-se nos Estados Unidos da América do Norte. O mesmo modelo indica que, espécies responsáveis por leishmaniose cutânea, no Brasil, nomeadamente *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Mg. migonei*, e que apresentam capacidade de adaptação a ambientes modificados, poderão apresentar uma expansão no que diz respeito à sua distribuição geográfica. Este modelo, está de acordo com o anterior modelo preditivo de 1975), no qual, em meados do século XXI, no norte do Brasil, haverá condições ainda mais propícias ao desenvolvimento de *Ny. whitmani* e que haverá, também, condições ambientais para a presença desta espécie no sul do País (Fig. 22).

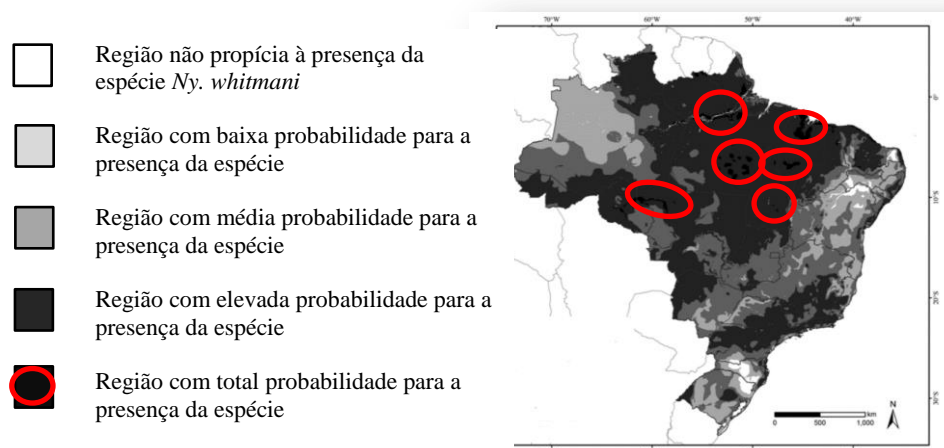


Fig. 22 - Mapa do Brasil onde estão assinaladas as regiões propícias à espécie *Ny. intermedia*, nos anos 2041-2060 (Adaptado de Rangel *et al.*, 2018)

Através de estudos sobre a avaliação de modelos climáticos (alterações climáticas), anteriormente realizados, Carvalho e colaboradores (2017), mostraram que as doenças transmitidas por vetores sofrem alterações na sua distribuição. Segundo Rangel *et al.* (2018), os programas de vigilância e controlo devem ser, então, implementados tendo como base modelos preditivos da influência das alterações climáticas nos vetores em causa.

As condições socioeconómicas, a disponibilidade e qualidade dos serviços de saúde, a educação, e a precariedade, em geral, são fatores prejudiciais à saúde humana (Neves *et al.*, 1997). As alterações ambientais, por ação humana, como por exemplo, migrações populacionais por questões sociais, ou conflitos bélicos, podem promover o aumento das leishmanioses, quer nas regiões de origem dessas populações, quer nas regiões para onde migram. Desde 2008 que se tem registado um aumento do número de migrantes, provenientes maioritariamente da Síria e da Eritreia, entre os quais a doença mais comum é a leishmaniose, e *L. tropica* a espécie mais frequente (Isenring, *et al.*, 2018). A reemergência da leishmaniose cutânea no Velho Mundo tem sido observada, mais recentemente, na Síria devido ao colapso do sistema de saúde pública e à exposição de pessoas não imunes aos vetores. Este facto, deve-se à ocorrência da guerra que graça em todo o País. Entre 2000 e 2012, o Líbano reportou seis casos de leishmaniose cutânea, em libaneses, e 1033, em 2013, dos quais 97% eram refugiados sírios (Burza *et al.*, 2018).

As alterações ambientais por catástrofes naturais podem, também, levar a que uma determinada região se torne favorável, ou mais propícia, ao desenvolvimento de flebotomíneos vetores (Fig. 23).



Fig. 23 - Irão, biótopo modificado por catástrofe natural (terramoto), formando abrigos naturais favoráveis ao desenvolvimento flebotomínico e reemergência de leishmaniose cutânea. O círculo reforça a imagem no que diz respeito à habitação humana destruída, com buracos, matéria orgânica em volta, e pessoas nas imediações (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

### 1.12 Controlo dos vetores na luta integrada contra as leishmanioses

Tal como foi referido nos pontos anteriores, as leishmanioses, no Velho e no Novo Mundo, são doenças de grande complexidade, o que dificulta a implementação de quaisquer medidas de controlo, nomeadamente no que diz respeito aos vetores (Iriso *et al.*, 2017b; Moriconi *et al.*, 2017). No Brasil, por exemplo, a urbanização de *Lu. longipalpis* tem sido o fator decisivo no insucesso dos programas de controlo vetorial. Este facto, aliado à elevada densidade de espécies, potencialmente vetoras, e o seu comportamento antropofílico nas principais áreas de transmissão, tem dificultado a aplicação de medidas de controlo (Salomón, *et al.*, 2015).

Para o desenvolvimento de um controlo vetorial integrado, e eficaz, torna-se imprescindível o conhecimento da epidemiologia da doença, da distribuição, da bioecologia das espécies vetoras, do registo da presença humana e de reservatórios

animais (Lane, 1991; Afonso & Alves-Pires, 2008). Neste âmbito, uma das ações desenvolvidas é o plano estratégico para o controlo da leishmaniose na Europa 2014-2020. Este plano tem como objetivo, até 2020, eliminar a mortalidade por leishmaniose visceral, reduzir significativamente a morbilidade causada por leishmanioses e contribuir para melhorar o estado de saúde das populações em risco (Ejov & Dagne, 2014).

Existem vários tipos de medidas que visam o controlo, mediante a redução do contato reservatório/hospedeiro - vetor, nomeadamente o controlo químico, com a utilização de inseticidas, o controlo ambiental, através de luta biológica ou impedindo a reprodução dos vetores, e ainda através da diminuição de criadouros domésticos e peridomésticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o tratamento dos doentes é imprescindível. No que diz respeito ao reservatório canino, o tratamento da leishmaniose deve ser efetuado, ainda que em termos vetoriais não tenha sucesso.

A utilização de métodos de controlo de flebotómios adultos, como a utilização de inseticidas (organofosfatos, carbamatos, piretróides sintéticos), quer através de pulverizações intradomiciliares, quer de redes mosquiteiras impregnadas, são os que mais têm resultado comparativamente à tentativa de identificar e destruir os biótopos larvares, uma vez que são pouco conhecidos, ou encontrados, na Natureza, devido ao tipo de ciclo de vida que estes insetos apresentam. A utilização de inseticidas requer a formação de pessoal especializado, de modo a que as pulverizações ocorram em segurança, e de forma a diminuir a possibilidade de resistências aos diferentes produtos utilizados.

Medidas de controlo biológico, através da utilização de bactérias como *Bacillus thuringiensis*, mais específicas para os estados larvares, ou através de ácaros, poderão contribuir para a diminuição da densidade vetorial, ainda que, como se mencionou anteriormente, sejam de difícil aplicação (Pires *et al.*, 1997). É também possível o cultivo de plantas autóctones nocivas/repelentes para os flebotómos (Schlein *et al.*, 2001) e a utilização de feromonas sintéticas para atrair os flebotómios para locais com inseticidas (Bray *et al.*, 2009).

Para que as medidas de controlo possam, de alguma forma, ter sucesso, a população local deve ser envolvida e esclarecida através de ações de sensibilização. Assim, mais facilmente poderão compreender e aderir ao que se pretende (Fig. 24). Uma das medidas que poderá ser implementada é a limpeza de terrenos com matéria orgânica, de modo a evitar a formação de criadouros e a atração de eventuais reservatórios

silváticos. A limpeza dos galinheiros, coelheiras e outros abrigos animais é imprescindível, por exemplo, nos Países mediterrânicos. A pintura de muros e paredes das habitações humanas e de abrigos animais é também aconselhada. Comportamentos defensivos, das populações humanas, devem ser promovidos e adotados, em particular em zonas de leishmaniose cutânea (Depaquit & Léger 2017; Iriso *et al.*, 2017b). Nos meses de maior densidade e no período de atividade flebotomínica, deve ser evitado o contacto com os vetores, utilizando repelentes e vestuário apropriado.



Fig. 24 - Envolvimento das comunidades locais de áreas endêmicas de leishmaniose. Educação sanitária transmitida por trabalhadores qualificados e cartazes explicativos, fundamentais para que a mensagem sobre a doença e os vetores possa ser atingida. **A** - Índia; **B** - Bolívia; **C** - Bangladesh (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

Os cães, como principais reservatórios de leishmaniose visceral, têm também sido alvo de medidas preventivas, no que diz respeito a esta zoonose. Nas zonas risco, devem ser usadas coleiras impregnadas com inseticidas, que reduzem a picada das fêmeas e conduzem à morte destas aquando do contacto. A utilização de coleiras tem apresentado grande eficácia nas regiões da Bacia do Mediterrâneo, onde a transmissão ocorre particularmente nos meses de verão e *P. perniciosus*, uma das principais espécies vectoras, ainda que tenha uma grande plasticidade trófica, tem preferências cinófilas (Marzochi, *et al.*, 2014). Em áreas endêmicas, ou suspeitas, de leishmaniose canina, estudos sobre a reação imunológica dos cães à saliva de *P. perniciosus* têm sido realizados, tendo em vista a avaliação dos programas de controlo vetorial. Contudo, segundo Willen *et al.*

(2018), poderão verificar-se reações cruzadas entre as proteínas salivares de flebotómíneos do subgénero *Larrousius*. Para confirmação, seriam necessárias colónias laboratoriais de outras espécies de flebotómíneos da mesma área de *P. perniciosus*.

A utilização de vacinas em cães, tem vindo a ser desenvolvida e introduzida não só em Portugal, mas também no Brasil (Regina-Silva *et al.*, 2016). No entanto, dado o elevado custo, para a grande maioria dos proprietários, a utilização das mesmas não é ainda uma prática comum. Lamentavelmente, em países como Portugal, os animais de companhia, nomeadamente cães e gatos, têm sido, cada vez mais, abandonados, particularmente no período de férias de verão, o que conduz a um maior risco do aumento da leishmaniose. Assim, logo nas escolas primárias, as crianças deveriam aprender que os animais de companhia, ou outros, “não são bonecos, nem meros caprichos” e que os devemos respeitar e tratar como membros da nossa casa e que devem ir ao veterinário e ser tratados quando doentes.

Numa diferente perspetiva, no Irão, com a existência de roedores como reservatórios de leishmaniose, a identificação e a eliminação destes, tem sido introduzida como medida de controlo (Fig. 25).



Fig. 25 - Irão, contribuição para o controlo da leishmaniose através do envenenamento de roedores, reservatórios do parasita. Os produtos tóxicos são colocados nas tocas (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

Em áreas endémicas, e no caso da migração de pessoas vindas de áreas igualmente endémicas de leishmaniose, os serviços de saúde devem realizar análises específicas a dadores de sangue e de órgãos (Marzochi, *et al.*, 2014).

As leishmanioses continuam a ser classificadas como doenças negligenciadas não atraindo financiamentos suficientes para a sua monitorização, vigilância e controlo, para que, efetivamente, o seu estudo faça parte do conceito “One Health - Uma só saúde” aliando sinergismos entre médicos, veterinários, investigadores e autoridades de saúde. Todas as ações deverão ser implementadas no sentido de interromper o ciclo epidemiológico ou, pelo menos, reduzir a capacidade de transmissão. O controlo das leishmanioses depende de estudos epidemiológicos que venham a ser efetuados e, como tal, é essencial que áreas endémicas e de risco sejam monitorizadas para que medidas preventivas possam ser corretamente aplicadas e planeadas de acordo com cada local, região e País.

### **1.12.1 Importância da monitorização vetorial em áreas endémicas e/ou em risco**

Os estudos epidemiológicos e a monitorização são fundamentais para que medidas efetivas de controlo possam ser implementadas. Atendendo a que as leishmanioses são consideradas das doenças mais relevantes para a saúde pública e animal, causadas por protozoários e, simultaneamente, das mais negligenciadas, torna-se essencial perceber quais as reais causas de um surto epidemiológico, suas consequências, e a permanência de focos e expansão dos mesmos. Somente conhecendo indicadores entomológicos como a densidade e a abundância flebotomínica, entre outros parâmetros, é possível verificar as alterações no comportamento dos vetores, em relação a diferentes biótopos, e assim prever padrões epidemiológicos.

A vigilância deverá incluir estudos de monitorização flebotomínica, como a realização de capturas regulares em ambientes domésticos, peridomésticos e silváticos, e em diversos biótopos propícios à presença flebotomínica. As espécies capturadas devem ser identificadas, bem como as suas fontes alimentares e taxas de infeção por *Leishmania*, e todos os parâmetros bioecológicos devem ser determinados e interpretados. Assim, será possível conhecer as espécies existentes, a sua distribuição sazonal e abundância relativa, bem como os meses de maior risco de transmissão. Com estes dados, deverão, então, ser planeadas e implementadas medidas de controlo.

Durante os trabalhos de campo, mesmo que espécies flebotomínicas, atualmente, não associadas à transmissão de leishmaniose sejam capturadas, a sua identificação não é

menos importante, pois podem ser transmissoras de outras doenças, como arboviroses, ou, por eventuais alterações climáticas, ambientais, ou aumento da densidade dessa(s) espécie(s) podem, eventualmente, estarem infetadas, ou tornarem-se infetantes. Uma área em risco pode ser uma região sem casos autóctones de leishmaniose humana e/ou canina, mas que é contígua a uma região com casos registados e que reúne condições propícias ao estabelecimento de espécies flebotomínicas.

O conhecimento dos ciclos bioecológicos e o registo de casos humanos foi essencial para controlar o surto de leishmaniose visceral que, recentemente, ocorreu em Madrid devido a alterações ambientais produzidas pelos seres humanos (Jiménez *et al.*, 2013). Um novo ciclo, no limite entre uma área silvática e periurbana, surgiu num parque urbano devido à introdução de lebres, que foram, posteriormente, detetadas infetadas com *L. infantum* (Fig. 26).



Fig. 26 **A** - Parque numa zona urbana de Madrid, Espanha, em que surgiram mais de 600 casos de leishmaniose visceral; **B** - Lebres, reservatórios de *L. infantum*, juntamente com os cães existentes na área (Adaptado de Alvar *et al.*, 2017)

No âmbito desta temática, um exemplo de estudos integrados, foi o que se realizou em algumas áreas da ilha de Creta, onde se registou uma elevada densidade de *P. neglettus* associada a um aumento do número de casos de leishmaniose canina. Através do estudo epidemiológico, global, foi possível verificar que a causa desta ocorrência deveu-se a que vários cães tinham sido trazidos de uma zona endémica, do continente, levando à dispersão e à reemergência da doença, uma vez que a espécie vetora estava presente e com condições para maior dispersão (Christodoulou *et al.*, 2012).

Apesar da introdução de *L. major*, com casos autóctones, ser pouco provável na Europa, uma vez que os seus reservatórios naturais não existem no território, o mesmo

não acontece com *L. tropica* e *L. donovani*, já que os seus vetores, *P. sergenti* e *P. tobbi* respetivamente, estão bem difundidos por vários países europeus, e o ser humano é o reservatório (Iriso *et al.*, 2017a). Contudo, há que não descuidar aquela hipótese.

A deteção de espécies de *Leishmania* nos vetores e nos hospedeiros vertebrados, mostram a importância do conhecimento mais aprofundado da diversidade genética e fenotípica dos parasitas circulantes, tal como aconteceu em Portugal, com as espécies híbridas isoladas a partir de doentes imunocomprometidos (Ravel *et al.*, 2006) e, em Espanha, com a identificação de uma fêmea de *S. minuta* infetada com *L. tarentula* (Bravo-Barriga, 2016).

São de extrema importância as espécies flebotomínicas vetoras permissivas, assim como as espécies de *Leishmania* que nelas se desenvolvem, como é o caso de *L. infantum* e *L. braziliensis* (Volf & Myskova, 2007; Antoniou *et al.*, 2013; Iriso *et al.*, 2017a). Nas áreas onde estas existem/coexistem, a monitorização anual é imprescindível, pois, pelas diferentes causas já referidas, num determinado ano a espécie vetora permissiva pode ser uma e no ano seguinte, de acordo com as capturas realizadas nas mesmas áreas, pode ser outra, o que para a realização de modelos matemáticos, no que diz respeito à dispersão de espécies vetoras, pode ser de extrema importância, tendo reflexos no controlo vetorial.

### 1.13 Objetivo geral

Caracterizar a fauna flebotomínica do Alentejo, Distritos de Évora e Beja, Portugal, não monitorizado há mais de 10 anos, e da Mesorregião Sul Fluminense, Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, nunca estudada de forma sistematizada, e determinar os fatores de risco para a presença de espécies vetoras de *Leishmania* spp. em ambas as regiões dos dois países, cuja ocorrência autóctone de leishmaniose visceral neste último, apenas se verificou em 2014.

#### 1.13.1 Objetivos específicos

- i.) Identificar as espécies flebotomínicas capturadas e caracterizar a distribuição geográfica das mesmas, em função dos distritos, freguesias, localidades, bairros e biótopos prospetados.

- ii.) Determinar a razão dos sexos, a proporção de fêmeas alimentadas e grávidas e relacionar o grau de rotação da genitália externa dos flebotomíneos machos com os locais de captura/eclosão.
- iii.) Determinar a taxa de infestação por ectoparasitas dos flebotomíneos capturados e determinar a taxa de infecção, por endoparasitas não *Leishmania*, nas fêmeas capturadas.
- iv.) Determinar a abundância relativa das espécies flebotomínicas.
- v.) Determinar as densidades flebotomínicas mensais por espécie e totais e determinar as densidades flebotomínicas em função do tipo e variedade de biótopos prospectados.
- vi.) Determinar a variação sazonal das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos.
- vii.) Determinar as taxas de infecção por *Leishmania* spp. das fêmeas capturadas.
- viii.) Identificar as refeições sanguíneas das fêmeas flebotomínicas ingurgitadas.
- ix.) Avaliar a(s) época(s) de maior risco de transmissão vetorial de *Leishmania* spp., determinar os fatores de risco para a presença de espécies flebotomínicas vetoras, nas regiões prospectadas, e relacionar com os aspetos bioecológicos presentes.
- x.) Contribuir para o conhecimento bioecológico e vetorial das regiões prospectadas, tendo em vista a monitorização e a vigilância das leishmanioses em ambos os países e reportar os resultados obtidos às Entidades e aos Serviços de Saúde de Portugal e do Brasil.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Caracterização das áreas de estudo: Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, e Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

As áreas de estudo compreendem duas regiões, uma do Velho e outra do Novo Mundo, nomeadamente os Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, e o Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

O Distrito de Évora situa-se na região do alto Alentejo e é limitado a norte pelos Distritos de Santarém e Portalegre, a leste por Espanha (província da Estremadura), a sul pelo Distrito de Beja e a oeste pelo Distrito de Setúbal. O Distrito é constituído por 14 concelhos: Alandroal, Arraiolos, Borba, Estremoz, Évora, Montemor-o-Novo, Mora, Mourão, Olivença, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa, ocupando uma área de 7.393 km<sup>2</sup>, sendo a cidade de Évora (38° 34'14" N; 7° 54'48" W) a capital (Fig. 27).

O Distrito de Beja situa-se no litoral e baixo Alentejo, sendo limitado a norte pelo Distrito de Évora, a este por Espanha, a sul pela região do Algarve e a oeste, pelo Distrito de Setúbal e Oceano Atlântico. A este Distrito, pertencem 14 concelhos, nomeadamente Aljustrel, Almodôvar, Alvito, Barrancos, Beja, Castro Verde, Cuba, Ferreira do Alentejo, Mértola, Moura, Odemira, Ourique, Serpa e Vidigueira que ocupam uma área de 10.225 km<sup>2</sup>. Este é o maior distrito de Portugal e representa 11,5% da área continental portuguesa. A cidade de Beja (38°00'55"N; 7° 51'45"W) é a capital (Fig. 27).

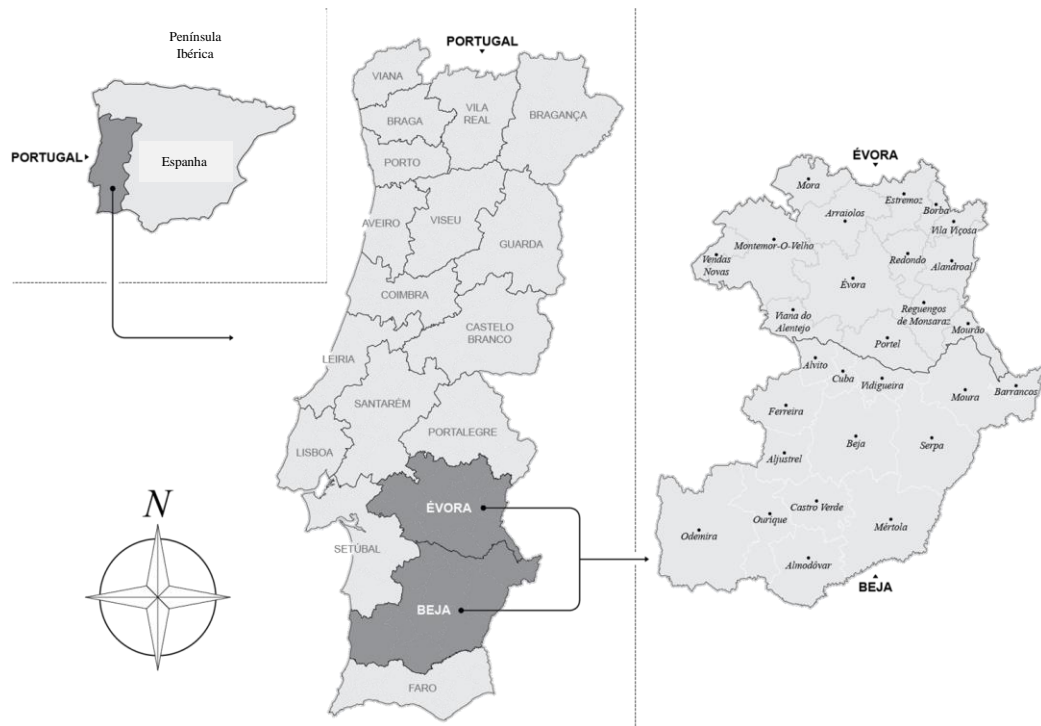


Fig. 27 - Mapa de Portugal continental em que estão assinalados os Distritos de Évora e Beja e os respetivos concelhos. As capitais dos dois Distritos estão igualmente assinaladas

O Município de Volta Redonda ( $22^{\circ}31'23''$  S;  $44^{\circ}06'15''$  W), situado no Estado do Rio de Janeiro, na região sudeste do Brasil, estende-se por uma área de  $180 \text{ km}^2$ , a 390 m acima do nível do mar e numa planície ao longo das margens do rio Paraíba do Sul. É considerada a maior cidade da região Sul Fluminense e dista 130 km da cidade do Rio de Janeiro. A cidade de Volta Redonda é limitada a norte e nordeste pelo Município de Barra do Piraí, e Pinheiral, a oeste por Barra Mansa e a sul por Rio Claro (Fig. 28).



Fig. 28 - Mapa do Brasil com a localização do Estado do Rio de Janeiro e do Município de Volta Redonda (Adaptado de [https://pt.wikipedia.org/wiki/Volta\\_Redonda](https://pt.wikipedia.org/wiki/Volta_Redonda) acessido a 11 de julho de 2018)

### 2.1.1 Demografia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2016), a população do Distrito de Évora, apresentou um decréscimo que se verificou desde os anos 60 do século XX. Contudo, a industrialização, sobretudo no concelho de Vendas Novas, dada a proximidade à zona industrial da Península de Setúbal, onde está localizada a empresa AutoEuropa - consórcio WW e Ford, e à Área Metropolitana de Lisboa, têm sido um fator de localização de algumas empresas e, portanto, do crescimento populacional. Ainda assim, a maioria dos concelhos, em 2015, não eram habitados por mais de 10.000 habitantes, sendo o concelho de Évora o que apresenta maior densidade populacional (Fig. 29).

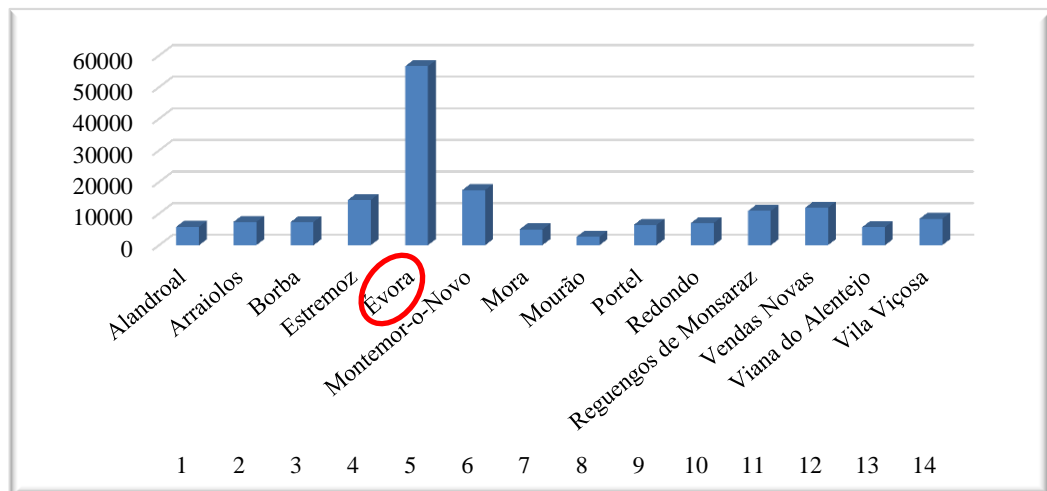


Fig. 29 - Número de habitantes dos 14 concelhos do Distrito de Évora, em 2015. (Adaptado de INE, 2015)

O Distrito de Beja registou um crescimento populacional entre 1864 e 1950, data a partir da qual se verificou um decréscimo, levando a que o número de habitantes, presentemente, seja semelhante ao que era há 150 anos. Os concelhos de Beja e Odemira são os que, atualmente, possuem o maior número de habitantes (Fig. 30).

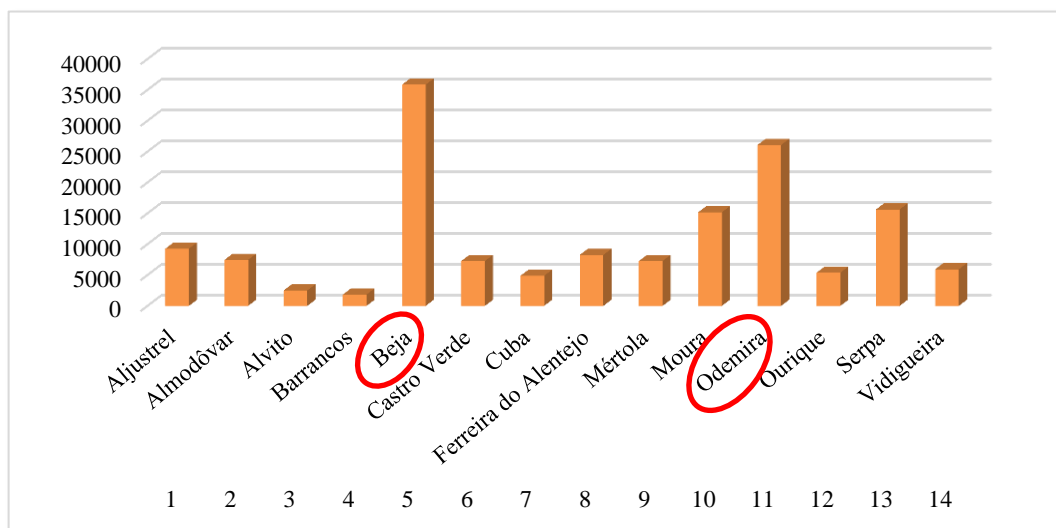


Fig. 30 -Número de habitantes dos 14 concelhos do Distrito de Beja, em 2015. (Adaptado de INE, 2015)

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a população no Município de Volta Redonda é de 265.201 habitantes. Até à década de 40 (século XX), o Município era fracamente povoado, contudo, com a instalação da

Companhia Siderúrgica Nacional, a população cresceu exponencialmente até aos anos 80, quando se instalou a crise económica, não tendo a população aumentado, significativamente, desde então (Fig. 31).

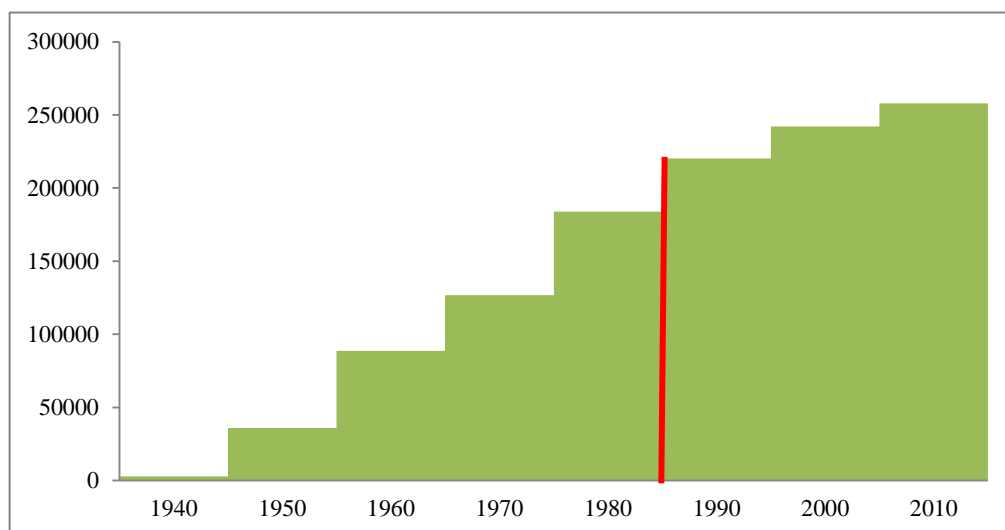


Fig. 31 - Evolução demográfica do Município de Volta Redonda, Brasil, desde 1940 a 2010. (Adaptado de IBGE, 2017)

### 2.1.2 Hidrologia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

A região alentejana apresenta três grandes bacias hidrográficas: Tejo, Sado e Guadiana, sendo esta última de grande importância na região. Na extremidade sudeste do Distrito de Évora, o rio Guadiana destaca-se por ser bastante profundo, em particular na região de Alqueva, onde o seu vale chega a ter mais de 100 m de profundidade. Dadas estas características, foi aqui construída a barragem do Alqueva, considerado o maior reservatório artificial de água da Europa, e que tem como objetivo o regadio para toda a região e produção de energia elétrica para vários concelhos. A hidrologia do Distrito de Beja é também marcada pelo rio Guadiana e afluentes, sendo o sistema aquífero de Beja um dos mais importantes reservatórios de águas subterrâneas da região.

No que diz respeito ao Município de Volta Redonda, Brasil, o rio Paraíba do Sul domina a paisagem urbana, sendo a principal fonte de abastecimento de água. A estrutura hidrográfica caracteriza-se também pela grande quantidade de riachos, que formam pequenas bacias ao longo do curso do referido rio.

### 2.1.3 Geologia: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

A nível geológico, o Distrito de Évora, apresenta recursos minerais não metálicos, de elevada importância económica, como mármore, granito e gabros, que predominam nos concelhos de Estremoz, Borba e Vila Viçosa (mármore), Arraiolos e Évora (granito). Relativamente ao Distrito de Beja, é notável a riqueza em cobre, nas minas de Algares, Moinho e São João do Deserto, em Aljustrel, e ainda as minas de Neves Corvo, em Castro Verde.

Em relação ao Município de Volta Redonda, a diversidade geológica está representada na fig. 32.

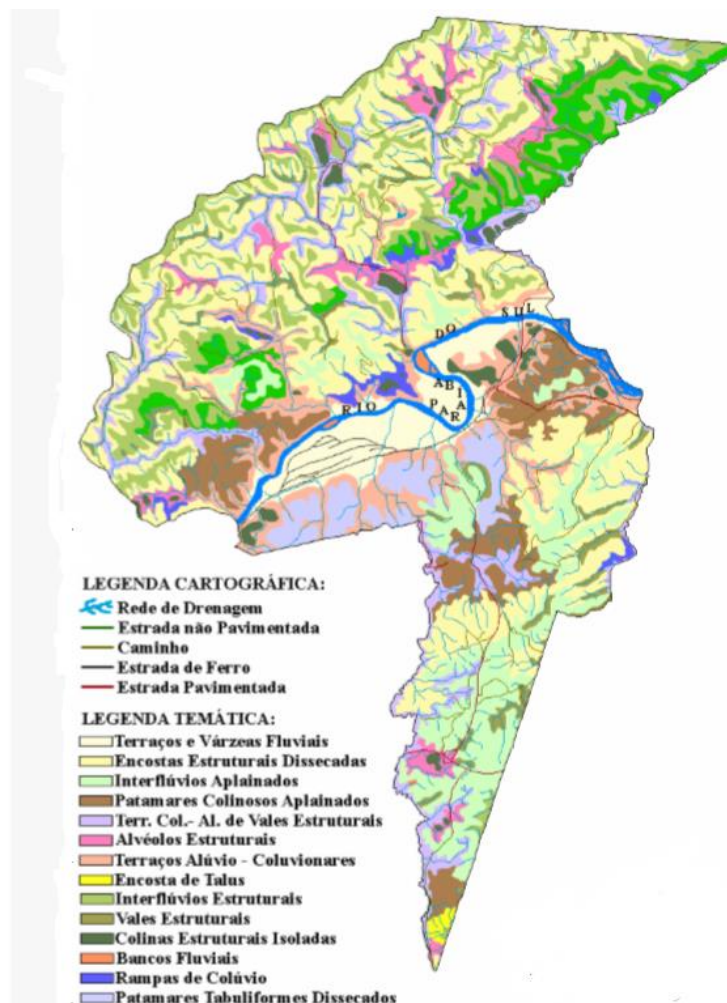


Fig. 32 - Geomorfologia do Município de Volta Redonda (Adaptado de Dias *et al.*, 2005)

#### **2.1.4 Clima - temperatura, precipitação, humidade relativa e ventos dominantes: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

O clima dos Distritos de Évora e Beja, é do tipo mediterrânico, segundo a Classificação climática de Köppen-Geiger, com chuvas distribuídas de forma desigual ao longo do ano. A pluviosidade máxima regista-se no inverno.

Em Évora, a temperatura média anual é de 15,8°C, mas, as variações mensais de temperatura são grandes. A média mensal mais alta verifica-se em agosto (23,3°C) e a mais baixa em janeiro (9,3°C). Os invernos são pouco chuvosos e frios e os verões, muito secos e com temperaturas elevadas. No verão, o número de horas de sol, por dia, pode chegar às 14h. Em 2016, a temperatura média anual, no Distrito de Évora, foi de 15,9°C e a pluviosidade de 629 mm.

No Distrito de Beja, a temperatura média foi de 17,4°C e 728 mm de pluviosidade. Assim, o período seco é, em regra, de três a quatro meses sendo a ocorrência de anos secos e chuvosos aleatória. De um modo geral, os ventos não são muito expressivos na região, registando-se ventos predominantes de noroeste em Évora, e de sudoeste e oeste em Beja (Camara Municipal de Évora, 2014; Câmara Municipal de Serpa, 2007).

O clima de Volta Redonda, Brasil, é tropical de altitude, mesotérmico, com verões quentes e chuvosos, e invernos secos. A humidade relativa do ar é alta (77%), mesmo nos meses frios (71% e 72%). A temperatura média é de 20°C, a média mínima anual de 16,5 °C e média máxima anual de 27,8 °C. A precipitação média anual é de 1400mm, sendo janeiro e fevereiro os meses com maior incidência de chuvas (<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-de-janeiro/volta-redonda-4043/> acedido a 17 de agosto de 2018).

#### **2.1.5 Coberto vegetal: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Em relação aos Distritos de Évora e Beja, as planícies de montado, com uma altitude média de 240m, fazem parte da paisagem de toda a região alentejana, onde predominam os sobreiros, as azinheiras e as oliveiras. A única exceção, à planície, é a Serra d'Ossa localizada no alto Alentejo, entre Estremoz e Redondo, que atinge os 650m.

O cultivo de cereais, em regime extensivo, é uma prática comum, tal como o arroz. As vinhas são, cada vez mais, desenvolvidas nesta região. Os espargos, as beldroegas, os poejos, e os coentros são espécies que abundam e que são aproveitadas na gastronomia. As práticas agrícolas ajustaram-se ao maior dividendo económico da região, a cortiça, hoje em dia com projeção mundial. Em algumas zonas é possível observar áreas de matagal mediterrâneo, encontrando-se ainda espaços de montado de azinho com sub-bosque mediterrânico de esteva, murta e carrasco. Nos limites de Ferreira do Alentejo, Beja, Cuba e Serpa (concelhos de Beja), verifica-se endemismo de linaria (*Linaria ricardoi*), única no Mundo (<http://www.quercus.pt/o-tejo-internacional/415-flora-e-vegetacao>).

Relativamente ao Município de Volta Redonda, Brasil, a paisagem é composta essencialmente por matas e plantações de eucaliptos. No entanto, uma pequena percentagem do terreno (20%), faz parte da Floresta de Cicuta, considerada Reserva Natural de Mata Atlântica, fazendo fronteira com áreas urbanas. Por se encontrar numa planície aluvial, formada por uma bacia sedimentar, ao longo do rio Paraíba do Sul, tem-se verificado o uso excessivo dos solos para monoculturas de café e pastoreio extensivo, o que tem contribuído para a erosão dos terrenos. A zona norte do Município tem um declive mais acentuado com encostas íngremes e de maiores altitudes. Na Floresta de Cicuta é comum a presença de árvores imponentes de Mata Atlântica, como o jequitibá, (*Cariniana legalis*) o pau-ferro (*Astronium graveolens*), o chichá (*Sterculia chicha*) e a figueira branca (*Ficus guaranitica*), muitas delas chegando a atingir mais de 35m de altura.

#### **2.1.6 Fauna: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

O Alentejo apresenta características únicas, que permitem que uma grande diversidade de espécies de aves, mamíferos e répteis se fixem nesta região. Assim, mais de duas centenas de espécies de aves podem ser observadas, algumas consideradas exóticas, como o caimão (*Porphyrio*) e a cegonha negra (*Ciconia nigra*), e outras aves com estatuto de raras ou ameaçadas. A existência de diversas grutas é de grande importância para quirópteros, morcego-rato-grande (*Myotis myotis*) e morcego-de-ferradura-mourisco (*Rhinolophus mehelyi*). As grandes áreas de montado têm um papel

relevante para a manutenção da fauna de pequenos mamíferos, como o rato de Cabrera (*Microtus cabreræ*), o gato-bravo (*Felis silvestris*), e as lebres (*Lepus europæus*). Dadas as características climáticas da região, existe uma grande diversidade de insetos durante praticamente todo o ano, como borboletas e libélulas. As abelhas são fundamentais para a manutenção da flora alentejana.

Os poucos fragmentos de Mata Atlântica que ainda se verificam no Município de Volta Redonda, Brasil, permitem a formação de refúgios para algumas espécies ameaçadas como a ave jacutinga (*Aburria jacutinga*), a preguiça (*Bradypus* sp.), o tatu (*Dasyurus novemcinctus*) e alguns quirópteros. A floresta de Cicuta, nos limites da cidade, é considerada um património ambiental e classificada como uma área de relevante interesse ecológico. Em termos faunísticos, destaca-se a presença de vários mamíferos, entre eles a paca (*Cuniculus paca*), a cutia (*Dasyprocta* sp.), o caxinguelê (*Sciurus aestuans*), a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), o bugio (*Alouatta fusca*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), estando estas duas últimas espécies ameaçadas de extinção.

## **2.2 Capturas flebotomínicas nos Distritos de Beja e Évora, Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil: concelhos, freguesias e localidades prospetadas**

Na região alentejana, previamente ao início da prospeção flebotomínica, foram realizadas duas saídas de campo, nos Distritos de Évora e Beja, tendo como objetivos estabelecer contatos com a comunidade e verificar, em várias localidades, as variedades de biótipos propícias à presença de flebotomíneos.

No total, e no que diz respeito ao Distrito de Évora, efetuaram-se prospeções flebotomínicas em 6 concelhos, 9 freguesias e 9 localidades, e no Distrito de Beja, no total, em 7 concelhos, 10 freguesias e 10 localidades, que serão apresentadas no capítulo de Resultados. As prospeções foram realizadas de maio a novembro de 2016 e de maio a novembro de 2017. Em 2016, durante o mês de setembro, não se efetuaram capturas devido a uma estadia de trabalho no Brasil.

No Município de Volta Redonda, Brasil, devido à ocorrência de casos autóctones de leishmaniose canina e humana, pela primeira vez reportados em 2014, Técnicos da Secretaria Municipal de Saúde, do Serviço de Vigilância Ambiental e do Centro de

Controle de Zoonoses de Volta Redonda, que colaboraram neste projeto, efetuaram prospeções flebotômicas, no total, em 15 localidades, correspondentes a 21 bairros deste Município. Em 2016, as prospeções foram realizadas de outubro a dezembro, em 2017, de fevereiro a dezembro, e em 2018, de janeiro a abril. Tal como para o Alentejo, estas localidades serão apresentadas no capítulo de Resultados.

### **2.2.1 Consentimento dos proprietários para a realização de capturas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Na região alentejana, tendo em vista a necessidade de serem colocadas armadilhas luminosas, tipo CDC, para capturas flebotômicas, em diferentes biótopos domésticos e peridomésticos, foi necessário, em primeiro lugar, dar conhecimento à população das diferentes localidades, sobre o trabalho que se pretendia desenvolver. Numa primeira fase, contataram-se Presidentes das juntas de freguesia, dos concelhos, apresentando a importância do trabalho a realizar, e as vantagens do mesmo quer para a região, quer para o País, em geral. Solicitou-se o apoio dos mesmos, em relação ao contacto com os proprietários de casas, terrenos, quintas, armazéns, abrigos de animais, como canis e outros, que fossem considerados propícios à captura de flebotomos. Simultaneamente, através de pessoas já conhecidas, nos dois Distritos, pôde-se também ter pontos de contacto e grande colaboração logística.

Após a apresentação do tipo de trabalho que se iria realizar, qual o interesse do mesmo, inclusivamente mostrando as armadilhas, como funcionavam e a que horas seriam postas e retiradas das suas propriedades, perguntava-se, aos proprietários, se estavam disponíveis em colaborar neste trabalho. O consentimento foi verbal, e todas as pessoas contadas disponibilizaram-se para que o mesmo pudesse ser concretizado. Há que referir, que todas as armadilhas foram colocadas no exterior das habitações humanas, desde paredes, muros, jardins, árvores de fruto, abrigos de animais, hortas e quintais. Não se colocaram armadilhas intradomiciliares, uma vez que as pessoas tinham animais de companhia e/ou crianças, e como as armadilhas são colocadas até 1,50 metros do solo, neste caso, os proprietários não podiam garantir que as armadilhas não fossem mexidas ou danificadas. Assim, optou-se para que todas fossem extradomiciliares, tal como outros estudos realizados em Portugal (Branco, 2011).

### 2.2.2 Caracterização do tipo e variedades de biótopos prospectados das áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

Neste estudo flebotomínico, os biótopos foram classificados em dois tipos: doméstico e peridoméstico. Caracterizou-se como biótopo, uma área de condições ambientais uniformes e considerou-se biótopo doméstico, o que dista a menos de 10 m da habitação humana, como por exemplo alpendres, muros junto às casas, armazéns contíguos às habitações, paredes exteriores da casa, churrasqueiras e outros, e biótopo peridoméstico, o que dista a mais de 10 m da habitação humana, incluindo-se, entre outros, abrigos animais (canis, pocilgas, cavalariças), jardim-árvores de fruto, jardim-flores, hortas, poços, Mãe de água. (Fig. 33).



Fig. 33 - Tipos e variedades de biótopos prospectados: **A** - biótopo peridoméstico, variedade curral veados, **B** - biótopo peridoméstico, variedade capoeira, **C** - biótopo doméstico, variedade muro de pedras, junto a habitação humana, **D** - biótopo doméstico, variedade armazém, contíguo a habitação humana. Assinalado a vermelho: tipo e variedade de biótopo; assinalado a azul: armadilha luminosa miniaturizada, tipo CDC (Fotografia - S. Pereira, Alentejo, 2016 e 2017)

### 2.2.3 Períodos de prospeção, determinação das coordenadas, temperatura, humidade relativa e velocidade do vento, e fichas de campo: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

No Alentejo, o período de prospeção flebotomínica ocorreu durante dois anos seguidos, 2016 e 2017, de maio a novembro, durante duas noites consecutivas, duas vezes por mês, tendo-se, no total, utilizado 178 armadilhas. Em 2016, colocaram-se, no total, 65 armadilhas, e em 2017, 113.

Para a determinação das coordenadas, nomeadamente latitude, longitude e altitude do local onde se colocava uma determinada armadilha, utilizou-se uma aplicação digital de GPS *Meo Drive* e *Digital Altimeter*. A determinação da temperatura e humidade relativa, da exata localização de cada armadilha (quer ao colocar, quer ao retirar), foram determinadas com recurso a um termohigrómetro (*Incoterm*, Indústria de Termómetros, Brasil Cotronic Technology Ltd). Para a determinação da velocidade do vento, usou-se um anemómetro (*Xplorer 1 Skywatch JDC Switzerland Electronic SA*).

Todos estes parâmetros foram registados, por armadilha, numa ficha de campo, (Anexo I) previamente realizada, e em que estes e outros dados foram anotados. Características, tais como a flora predominante, tipo de solo, presença de animais domésticos e /ou silvestres e, ainda, as fases da Lua e pluviosidade, foram igualmente anotados (Fig. 34). Caso se verificassem cães domésticos, o proprietário foi questionado sobre a utilização de coleiras impregnadas com inseticida.

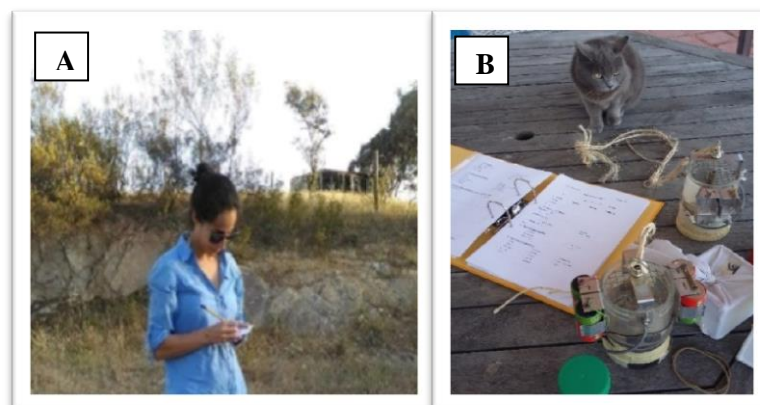


Fig. 34 **A** - Registo de dados, após a colocação de uma armadilha luminosa. **B**- Caderno de campo com as respetivas fichas, e duas armadilhas e uma gaiola (Fotografia: S. Pereira, 2017, Alentejo)

Em Volta Redonda, Brasil, a prospeção flebotomínica foi realizada durante três anos (2016, 2017 e 2018). No ano de 2016, as capturas realizaram-se de outubro a dezembro (três meses), no ano de 2017, realizaram-se todos os meses à exceção de janeiro (onze meses), e em 2018, de janeiro a abril (quatro meses). As capturas foram realizadas em dois dias consecutivos, por mês. Para cada captura foi, igualmente, preenchida uma ficha de campo (Anexo II).

#### 2.2.4 Método de captura e conservação dos exemplares capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

As capturas flebotomínicas, no Alentejo, foram realizadas através de armadilhas luminosas miniaturizadas do tipo CDC modificadas (*Hausherr`s Machine Works, Old Freehold Road, Toms River, NJ08753, USA*), e colocadas, desde o entardecer até ao amanhecer, nos diferentes biótopos, domésticos e peridomésticos, em ambiente rural e urbano. Este método de captura é utilizado, já que permite capturar exemplares adultos em plena atividade e em bom estado de conservação, não requerendo cuidados especiais de manuseamento. Também, devido ao seu tamanho, torna-se mais fácil o transporte (Branco, 2011; Depaquit & Léger 2017).

As armadilhas utilizadas são compostas por uma estrutura metálica, onde se insere um sistema elétrico ligado a uma fonte luminosa (lâmpada). Sempre que necessário, as pilhas, inseridas na referida estrutura, foram carregadas através de carregadores do tipo *Duracell Accu Recharger*. Os flebotomíneos, por apresentarem fototropismo positivo, são atraídos pela fonte luminosa e aspirados por uma ventoinha para a gaiola de retenção (Fig. 35).

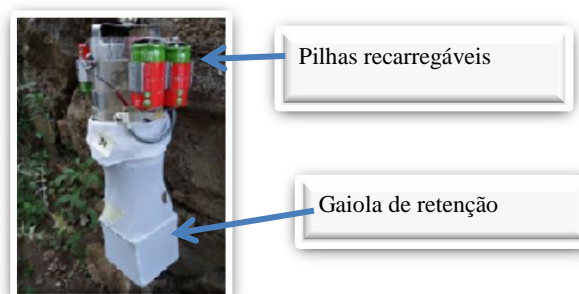


Fig. 35 - Aspeto geral da armadilha luminosa CDC (Fotografia S. Pereira, 2017, Alentejo)

Durante todo o período de capturas, as armadilhas foram sempre colocadas entre as 19 e as 20 horas, nos biótopos selecionados, tendo havido o cuidado de não ficarem em locais onde houvesse vento. Estas armadilhas são eficazes na atração de flebotomíneos num raio de 2 metros e foram colocadas no máximo até 1,5 metros do solo (Killick-Kendrick,1985).

Na manhã seguinte à colocação das armadilhas, estas eram retiradas entre as 7 e as 8 horas, e as gaiolas, onde se encontravam os insetos, eram colocadas em caixas isotérmicas, em cima de acumuladores (4°C), para diminuir a atividade dos insetos capturados. Antes destes serem manipulados, as gaiolas eram postas no frio (-20°C) até estarem mortos.

Após este período, todos os insetos foram aspirados com um aspirador manual (*Hausherr's Machine Works*) e acondicionados em tubos de plástico, em etanol 90%, devidamente etiquetados e identificados com o número do respetivo biótopo. Durante os dias de captura, e já com os insetos nos tubos de plástico, o material era, posteriormente, transportado em caixas de cartão, à temperatura ambiente, para o Laboratório de Entomologia Médica do IHMT, onde ficavam à temperatura ambiente, e no escuro, até o material ser processado para a identificação morfológica das espécies (Fig. 36).

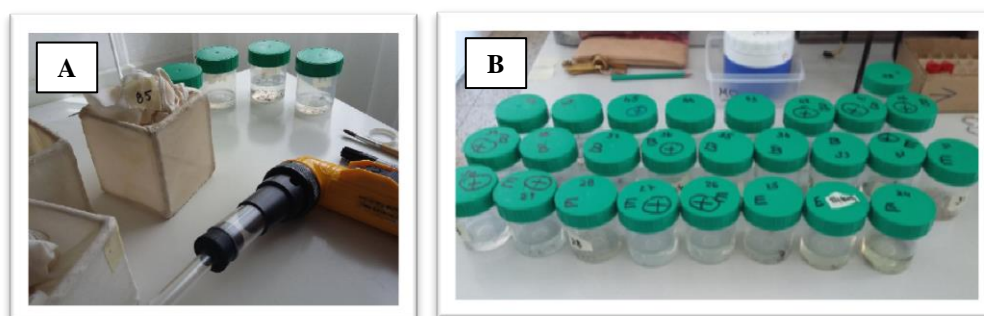


Fig. 36 **A**- Aspirador elétrico, gaiola de retenção de flebotomíneos, e tubos de plástico com etanol 90%, Alentejo; **B** - Tubos de plástico, já na bancada do Laboratório do IHMT, para serem separados os flebotomíneos de outros eventuais insetos (Fotografia S. Pereira, 2016)

Em Volta Redonda, Brasil, as capturas flebotomínicas foram realizadas por armadilhas luminosas CDC, modelo HP, munidas de pilhas (Fig. 37). Todo o processo, para se realizar as capturas flebotomínicas, foi idêntico ao que se efetuou no Alentejo. As armadilhas utilizadas apenas continham uma fonte luminosa como fator atrativo, não contendo quaisquer outros tipos de isco, nomeadamente gelo seco. A diferença mais

acentuada das armadilhas colocadas em Volta Redonda, é que estas apresentavam uma estrutura no topo que evitava a chuva ou grande humidade (Pugedo *et al.*, 2005).



Fig. 37 - Armadilha utilizada para capturas no Município de Volta, Brasil (Fotografia M. Vilela, 2017, Volta Redonda)

Os insetos capturados, no terreno, eram transportados para o Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Volta Redonda e postos a  $-6^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, eram colocados em tubos, tipo Falcon, em etanol, devidamente etiquetados de acordo com o número da ficha de campo/biótopo, e transportados para o Laboratório Interdisciplinar em Vigilância Entomológica de Díptera e Hemíptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, para identificação morfológica das espécies flebotomínicas capturadas.

### 2.3 Identificação morfológica das espécies flebotomínicas capturadas no Alentejo, Portugal, e em Volta Redonda, Brasil

A identificação morfológica de todos os exemplares adultos, capturados no Alentejo, foi efetuada no Laboratório de Entomologia Médica do IHMT. Antes de qualquer outro procedimento, realizava-se uma triagem para separar os flebotomíneos de outros pequenos insetos, e, em seguida, separavam-se os flebótomos machos das fêmeas, ao estereomicroscópio (*Wild Heerbrugg*, M-8), a uma ampliação de 12x (Fig. 38). Os machos e as fêmeas, já separados, eram acondicionados em diferentes tubos de plástico, também contendo etanol 90%, etiquetados com o respetivo número da armadilha utilizada, e marcação do sexo.



Fig. 38 - Placa de Petri com flebotomíneos, de ambos os sexos, para serem separados e colocados em diferentes tubos, devidamente etiquetados (Fotografia S. Pereira, 2017, Alentejo)

A triagem de insetos, capturados em Volta Redonda, foi igualmente realizada em placas de Petri, com etanol 90%, seguindo o procedimento atrás mencionado.

### **2.3.1 Metodologia aplicada para identificação das fêmeas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A identificação morfológica das espécies flebotomínicas fêmeas, capturadas no Alentejo, foi realizada pela observação morfológica das espermatecas, ao microscópio ótico (*Leitz-Dialux 22*), e a utilização de uma chave dicotômica, aplicada a exemplares da Península Ibérica (Branco, 2011).

As fêmeas foram retiradas do respetivo tubo de plástico, com uma pipeta de plástico, para uma placa de Petri com etanol 90%. Com uma pinça entomológica colocou-se, individualmente, cada fêmea no centro de uma lâmina, em posição lateral. Numa das extremidades da lâmina, colocou-se uma gota de soluto de Marc-André (soluto esclarecedor – Branco, 2011). De imediato, procedeu-se à disseção dos três últimos segmentos abdominais de cada fêmea, fazendo-se um corte transversal com dois estiletes, esterilizados (chama de uma lamparina). Seguidamente, e com uma pinça esterilizada, colocou-se a restante parte da fêmea num tubo Eppendorf de 1,5 ml, contendo etanol 90%, e devidamente etiquetado, para posterior procedimento molecular.

Na gota de soluto de Marc-André, onde se encontravam os três últimos segmentos abdominais, colocou-se uma microlamela e observou-se a preparação ao microscópio ótico, com ampliações de 125x, 312x e 500x (Fig. 39).

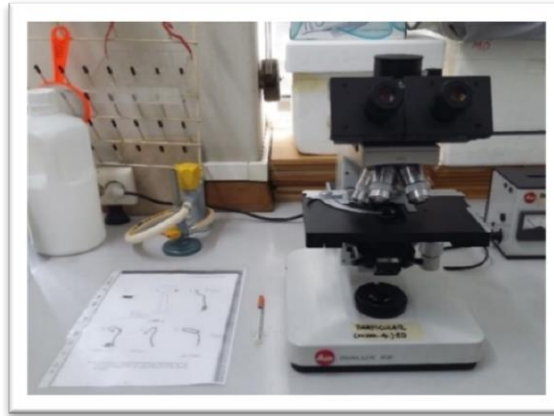


Fig. 39 - Microscópio ótico para identificação morfológica das espécies flebotomínicas fêmeas e folha com a representação esquemática das diferentes espermatecas (Fotografia S. Pereira, 2017)

Foi realizado o registo fotográfico das espermatecas, através de microscópio ótico (*Olympus BX51*), com câmara fotográfica incorporada, que serão apresentadas no Capítulo dos Resultados. Somente a observação das características das espermatecas (figuras 40 a 43), nomeadamente anéis do corpo, canais condutores, extremidade basal, presença/ausência de bolbo na região basal, espermateca tubular de paredes lisas e outras, permitem a identificação das espécies, tendo sido utilizada a chave de Branco (2011). Todos os exemplares foram numerados no caderno de Laboratório, fazendo-se a correspondência de cada número com cada espécie identificada. Cada tubo de Eppendorf, contendo o corpo de uma fêmea, *minus* genitália, foi também registado com o respetivo número.

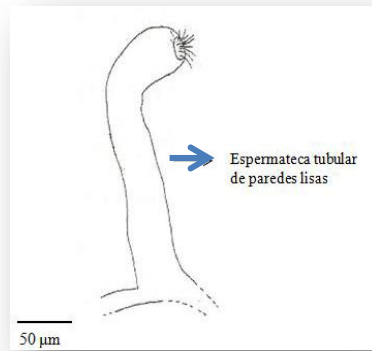


Fig. 40 - Esquema de espermateca de *Sargentomyia minuta*. Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011)

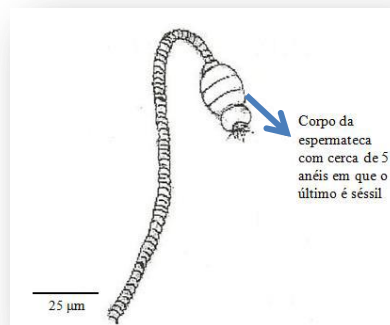


Fig. 41- Esquema de espermateca de *Phlebotomus sergenti*. Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011)

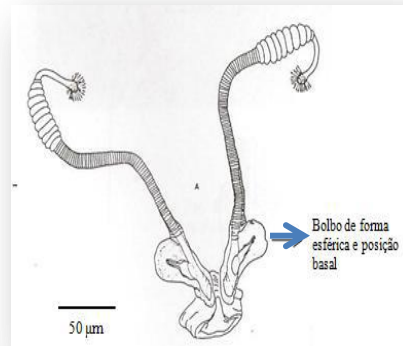


Fig. 42 - Esquema de espermateca de *Phlebotomus perniciosus*. Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011)

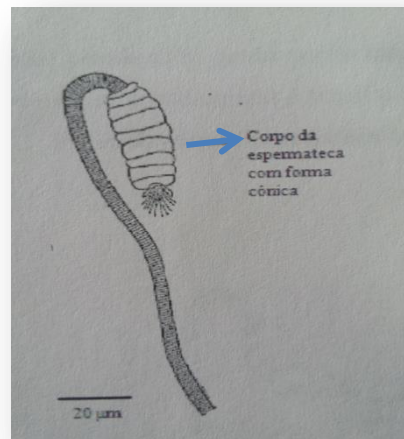


Fig. 43 - Esquema de espermateca de *P. papatasi*. Características morfológicas da mesma (Adaptado de Branco, 2011)

O referido procedimento foi realizado para todas as fêmeas capturadas, esterilizando-se o material utilizado, entre cada disseção, de forma a evitar contaminações. Também ao longo do processo foi registrado se a fêmea se encontrava grávida, parcialmente ou totalmente alimentada (ingurgitada - alimentação sanguínea), e, ainda, se estavam presentes ectoparasitas.

Para a identificação dos exemplares fêmeas, capturadas em Volta Redonda, Brasil, as asas e patas de cada exemplar foram removidas e colocadas numa gota de etanol numa lâmina de vidro. De seguida, a cabeça e os últimos três segmentos

abdominais foram seccionados e colocados numa gota de hidróxido de potássio a 10% (KOH). Estas estruturas foram observadas ao microscópio ótico para identificação da morfologia do cibário e das espermatecas e as fotografias, das espécies capturadas, serão apresentadas no capítulo dos Resultados. Os esquemas estão apresentados nas figuras 44 a 47.

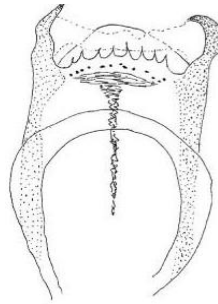


Fig. 44 - *Lutzomyia longipalpis* fêmea. Esquema das características morfológicas do cibário (Adaptado de Shaimabuku *et al.*, 2011)

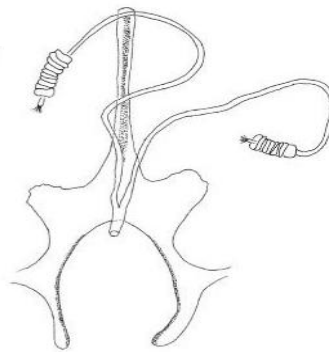


Fig. 45 - *Lutzomyia longipalpis* fêmea. Esquema das características morfológicas da espermateca (Adaptado de Shaimabuku *et al.*, 2011)

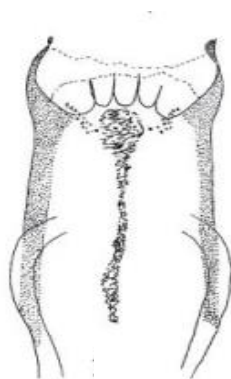


Fig. 46 - *Evandromyia sallesi* fêmea. Esquema das características morfológicas do cibário (Adaptado de Shaimabuku et al., 2011)

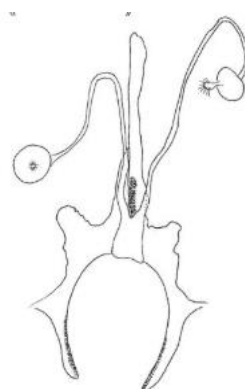


Fig. 47 - *Evandromyia sallesi* fêmea. Esquema das características morfológicas das espermatecas (Adaptado de Shaimabuku *et al.*, 2011)

### 2.3.2 Preparação das fêmeas, Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil, após identificação morfológica, para posterior análise molecular

Os restantes corpos das fêmeas (*minus genitalia*) foram colocados, individualmente, em tubos Eppendorf, com etanol 90%, devidamente etiquetados, de acordo com o número da armadilha onde foram capturadas, mantidas no escuro e à temperatura ambiente do Laboratório, IHMT (22°C), até serem enviadas para análise molecular.

As técnicas de biologia molecular, aplicadas, a todos os exemplares, fêmeas, capturados quer em Portugal, quer no Brasil, foram realizadas com a supervisão da Investigadora Doutora Daniela Pita-Pereira, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC/FIOCRUZ/Rio de Janeiro, Brasil. Cada fêmea foi processada individualmente e o DNA foi extraído de acordo com a metodologia descrita em Pita-Pereira *et al.*, 2008.

### **2.3.3 Metodologia aplicada para identificação dos machos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A identificação morfológica dos flebótomos machos, a nível de espécie, baseou-se nas características da genitália externa, recorrendo-se a uma chave dicotómica para as espécies assinaladas em Portugal, de acordo com Branco (2011).

Os exemplares, de cada armadilha utilizada, foram dispostos, individualmente, em posição lateral, ou posterior, com a ajuda de uma pinça entomológica, num godé de vidro, contendo etanol 90%, de modo a que a genitália ficasse na posição correta para a observação e identificação da espécie ao estereomicroscópio. As características morfológicas do gonocoxito, gonóstilo, espinhas a diferentes níveis e espessuras, edeago ou pénis, parâmeros, lobos laterais e basais foram observadas (Fig. 48). Tal como se efetuou para as fêmeas, registou-se no caderno de laboratório as identificações realizadas, por biótopo. O grau de rotação da genitália externa dos machos (total, parcial, ou não rodado) foi também anotado, por exemplar e por espécie.

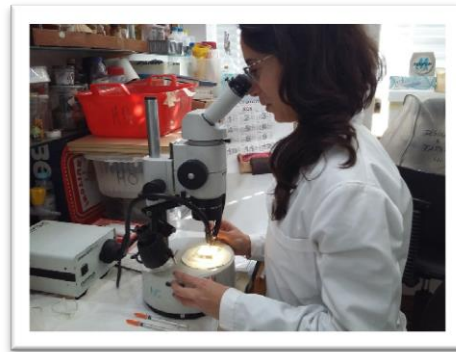


Fig. 48 - Identificação morfológica de flebotomíneos machos, ao estereomicroscópio (Fotografia S. Pereira, 2016)

Nas figuras 49 a 53 estão representados esquemas das genitálias externas de machos das espécies existentes em Portugal, até à data, e que foram capturadas durante o trabalho de campo. As fotografias tiradas ao estereomicroscópio serão apresentadas no capítulo dos Resultados.

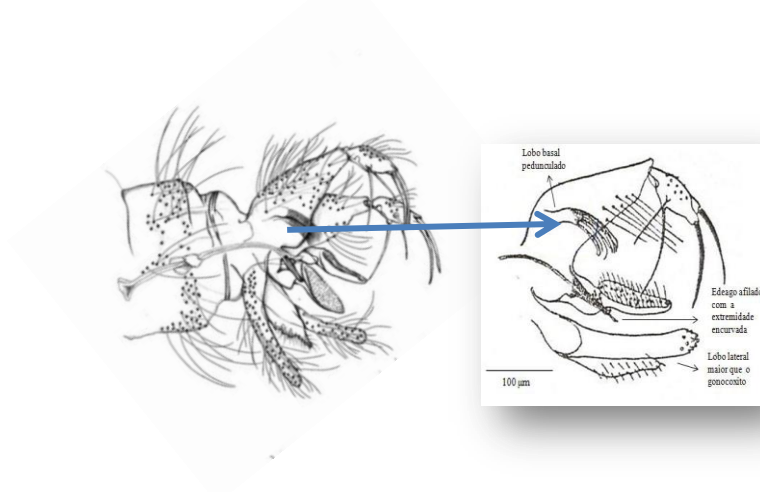


Fig. 49 - *Phlebotomus sergenti* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o lobo basal pedunculado, característico desta espécie

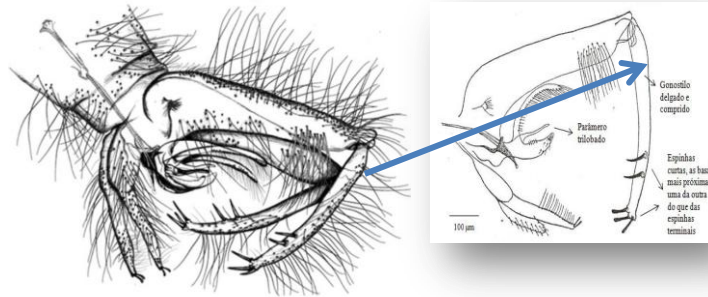


Fig. 50 - *Phlebotomus papatasi* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o gonóstilo delgado e comprido com espinhas curtas, características desta espécie.

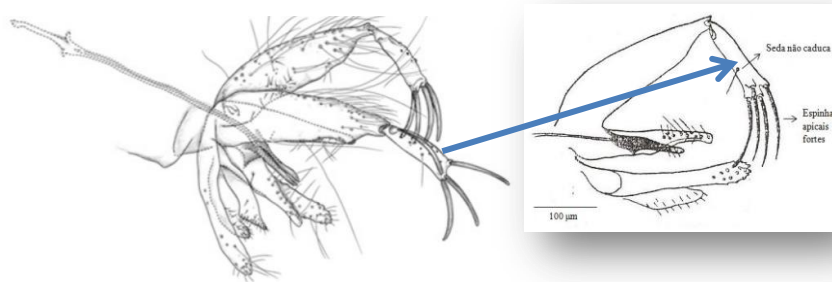


Fig. 51- *Sergentomyia minuta* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o gonóstilo com 4 espinhas apicais fortes e uma seda não caduca, características desta espécie

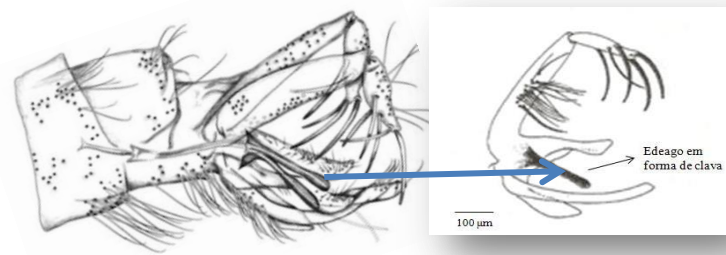


Fig. 52 - *Phlebotomus ariasi* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o edeago, ou pênis, em forma de clava, com dilatação subapical moderada, características desta espécie

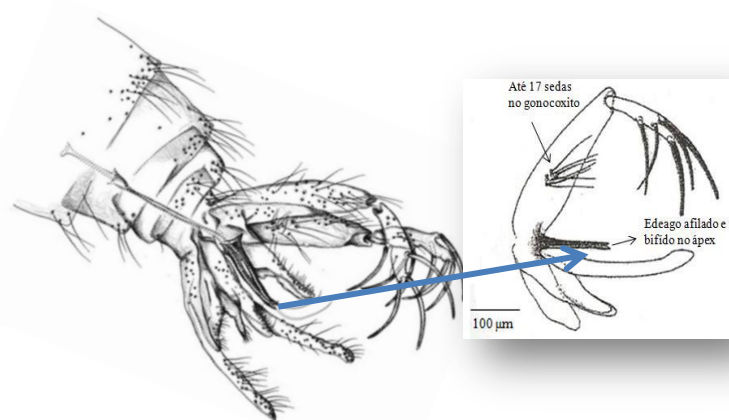


Fig. 53 - *Phlebotomus perniciosus* macho. Desenho da genitália, adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2014 e esquema das estruturas da genitália, adaptado de Branco, 2011. A seta azul mostra o edeago, ou pênis, afilado e bifido no ápex, características desta espécie

Para a identificação morfológica dos flebotomíneos machos, capturados em Volta Redonda, Brasil, foi necessário realizar-se um processo de clarificação e diafanização das estruturas de acordo com o descrito por Vilela *et al.* (2003). Este processo consiste em mergulhar os exemplares em potassa (KOH) a 10%, durante 2 a 3 horas, seguido de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) durante 20 min. Os exemplares são lavados em água Tipo II durante 20 min e mantidos em lactofenol durante 24 horas. Após a realização deste procedimento, os exemplares foram montados, entre lâmina e lamela, em líquido de

Berlese, com recurso a uma lupa binocular Stemi DV4 Zeiss, e transferidos para o microscópio *Opticam Microscopy Technology*.

Para o diagnóstico das espécies, no que diz respeito aos exemplares machos, foram observadas as seguintes estruturas da genitália externa: gonóstilo, espinhos do gonóstilo e gonocoxito, parâmeros, tamanho e porção terminal dos ductos (canais) edeagais, bomba espermática, lobo epandrial e cercos (Fig. 54). Em paralelo com a identificação morfológica dos machos foi avaliado o grau de rotação da genitália externa.

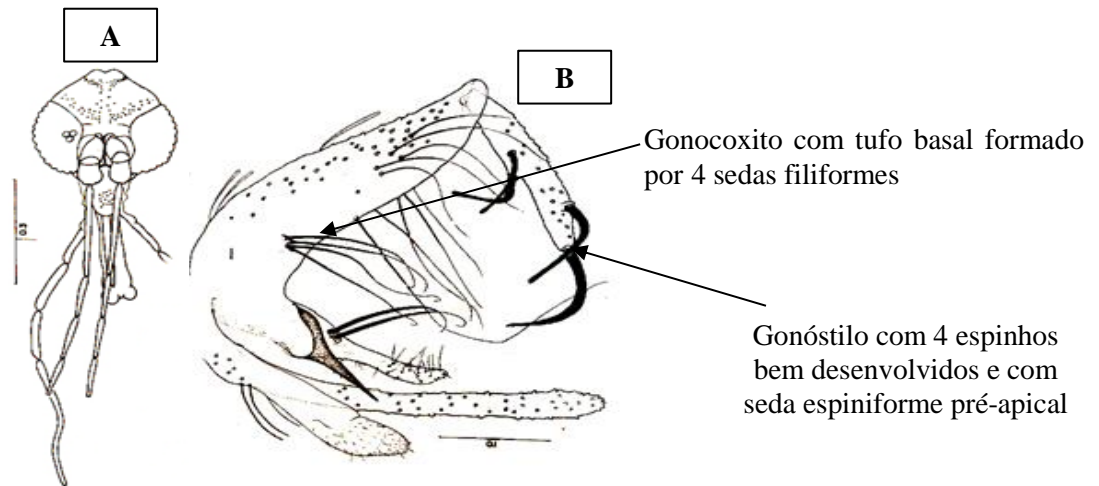


Fig. 54 **A** - Esquema da cabeça de *Lutzomyia longipalpis*; **B** - genitália externa de um macho da mesma espécie (Adaptado de Young, 1979)

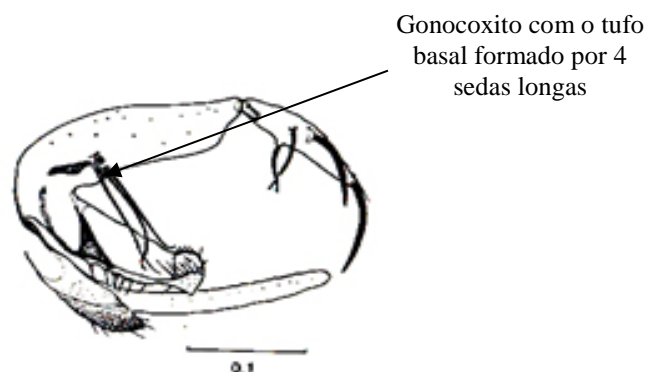


Fig. 55 - Esquema da genitália externa de *Evandromyia (Barrettomyia) sallesi* macho (Adaptado de Young, 1979)

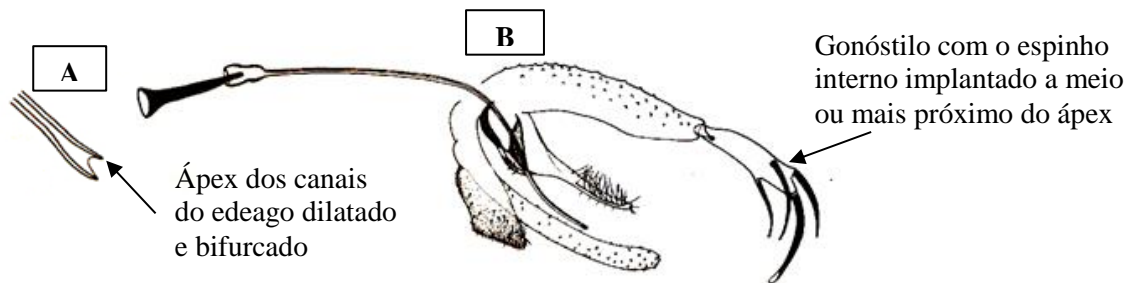


Fig. 56 A - Esquema da extremidade distal dos canais, ou espículos ejaculadores, bifurcada; B - genitália de *Nyssomyia whitmani* macho (Adaptado de Young, 1979)

## 2.4 Parâmetros bioecológicos e vetoriais determinados a partir de espécimes capturados no Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

Tendo em vista os objetivos deste trabalho, determinaram-se vários parâmetros que são descritos nos pontos a seguir.

### 2.4.1 Número de espécies flebotômicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

Após a identificação morfológica das espécies flebotômicas, determinou-se, em relação à região alentejana, e aos dois Distritos estudados, se as cinco espécies existentes em Portugal, estavam ou não presentes durante os anos 2016 e 2017.

No que diz respeito a Volta Redonda, Brasil, uma vez que não tinham sido realizados estudos entomológicos, dirigidos à presença de espécies flebotômicas, com as capturas realizadas durante três anos consecutivos, 18 meses, e através da identificação de todos os exemplares capturados, determinou-se o número de espécies presentes naquela região, em particular no que diz respeito às localidades e bairros.

#### **2.4.2 Abundância relativa de espécies flebotomínicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A abundância relativa das espécies flebotomínicas, capturadas nos dois países, foi determinada a partir do número de exemplares capturados de uma determinada espécie, sobre o número total de exemplares capturados das várias espécies, a multiplicar por cem (%).

#### **2.4.3 Densidade flebotomínica por espécie e por mês, variação sazonal, e mês (ou meses) de maior risco de transmissão nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A densidade flebotomínica por espécie corresponde ao número de exemplares capturados de uma determinada espécie por armadilha CDC, noite. A densidade flebotomínica por mês/variação sazonal corresponde ao número total de flebotomíneos, capturados durante um determinado mês de atividade flebotomínica, por armadilha, noite. Em relação ao mês/meses de maior risco de transmissão, este(s) corresponde(m) ao mês/meses cuja densidade de uma ou mais espécies comprovadamente vetoradas, ou suspeitas, é mais elevado.

#### **2.4.4 Densidade flebotomínica total e por espécie, por tipo e variedade de biótopos nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Corresponde ao número total de exemplares, de todas as espécies, ou de uma determinada espécie, capturados num tipo, e/ou variedade de biótopo, por armadilha noite.

#### **2.4.5 Razão dos sexos dos flebotomíneos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Esta razão traduz o número de machos existentes para cada fêmea, e é calculada pelo número total de machos a dividir pelo número total de fêmeas. Este parâmetro pode ser calculado por espécie ou pelo conjunto de todos os exemplares capturados.

#### **2.4.6 Proporção de fêmeas ingurgitadas e grávidas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Durante a identificação morfológica das fêmeas, registou-se o número de exemplares que tinham realizado uma refeição sanguínea (total ou parcialmente) ou que estavam grávidas (com ovos no abdómen). A proporção é calculada pelo número de exemplares, total ou por espécie, sobre o número total de fêmeas capturadas, a multiplicar por cem (%).

#### **2.4.7 Grau de rotação da genitália dos machos, total e por espécie, capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

O grau de rotação é uma classificação atribuída à genitália externa dos machos, e ao tipo de rotação que sofreu ou não. Esta pode ser total, parcial ou sem rotação, e é determinada ao estereomicroscópio. A determinação deste parâmetro permite relacionar o local de captura com o local de eclosão dos machos, ou seja, as armadilhas terem sido colocadas mais próximas ou mais distantes do local de postura e eclosão.

#### **2.4.8 Taxa de infestação de flebotomíneos, por ectoparasitas, capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A taxa de infestação corresponde ao número de flebotomíneos infestados por ectoparasitas, sobre o número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%). A presença de ectoparasitas verifica-se quando se realiza a identificação das espécies flebotomínicas.

#### **2.4.9 Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A influência das fases lunares é determinada a partir dos registos das fases lunares existentes nos dias/meses de captura, relacionando estas, com as densidades totais flebotomínicas. Neste trabalho determinou-se a influência da Lua Nova e da Lua Cheia na densidade total de flebotomíneos capturados durante o período de estudo.

#### **2.4.10 Taxa de infecção por *Leishmania* sp. das espécies flebotomínicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

A taxa de infecção corresponde ao número de fêmeas flebotomínicas infetadas por *Leishmania* sobre o número total de fêmeas, analisadas por técnicas de biologia molecular, a multiplicar por cem (%).

#### **2.4.11 Proporção das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotomínicas capturadas nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Após identificação das refeições sanguíneas, por técnicas moleculares, é calculado número de fêmeas (de uma determinada espécie, ou de todas as espécies capturadas) que se alimentou num determinado hospedeiro vertebrado, sobre o número total de fêmeas alimentadas, a multiplicar por cem (%).

### **2.5 Análise molecular das fêmeas flebotomínicas capturadas nos dois países: detecção de DNA de *Leishmania* sp. e determinação das refeições sanguíneas**

#### **2.5.1 Lise e extração de DNA a partir de flebotomíneos**

Para a realização da técnica de PCR, o DNA foi extraído a partir do extrato individual de flebotomíneos machos e fêmeas, em 100 µL de tampão de lise: TE - 10 mM Tris-HCl pH 9,2 constituído por 10 mM de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) e 100 µg/mL de proteinase K (US Biolog).

Os lisados foram mantidos em tubos eppendorf e incubados, entre duas a três horas a 56°C, com agitações periódicas. No final da incubação, o material foi centrifugado a 9800×g durante 15 min, e o sobrenadante extraído e aquecido durante 15 min a 95 °C. As amostras foram centrifugadas novamente a 9800×g durante 40s a 4°C (Miranda *et al.*, 2002). Posteriormente, os volumes das preparações foram ajustados para 200 µL adicionando TE 1:10 e armazenadas a - 20 °C até o momento da extração do DNA total.

Para a extração de DNA, a partir dos lisados individuais de flebotomíneos, foi utilizado o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA), seguindo as especificações do fabricante. O DNA foi eluído em 50 µL de TE 1:10 e posteriormente armazenado a - 20 °C até o momento da sua utilização. Exemplares machos foram utilizados como controlo negativo, uma vez que não podem apresentar DNA de *Leishmania* spp. Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa, foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro diluído (1:100) e exposição a raios UV.

### **2.5.2 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos pela amplificação da região conservada do minicírculo de kDNA em *Leishmania* spp. e gene *cacophony* em flebotomíneos capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

Para a reação de PCR foram utilizados dois pares de iniciadores (*primers*) que amplificam simultaneamente na mesma reação, um produto de 120 pb referente ao DNA de *Leishmania* (para amostras de fêmeas positivas) e outro de 220 pb correspondente ao DNA de flebotomíneo (todas as amostras de machos e fêmeas). O primeiro par amplifica a região conservada dos minicírculos do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3'] (Passos *et al.*, 1996). O segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebotomíneos (*cacophony*) de 220pb: 5Llcac [5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'] e 3Llcac [5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3']. Este último par confere eficiência à extração (controlo interno) uma vez que todas as amostras (machos e fêmeas) devem amplificar o produto referente a esse alvo.

A sensibilidade da técnica de PCR para deteção de leishmanias é independente do número, estadio ou localização dos parasitas no aparelho digestivo, o que aumenta a sensibilidade da técnica quando comparada com outras (Pita-Pereira *et al.*, 2009).

As reações ocorreram num volume final de 100 µL, constituído por solução tampão da PCR 1X (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 4,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 µL de DNA e H<sub>2</sub>O (ultrapura e estéril) para

completar o volume. A ciclagem térmica consistiu em 36 ciclos e foi realizada no aparelho modelo *Gene Amp® PCR System 9700*, com a seguinte programação por cada ciclo: desnaturação durante 30s a 94°C, anelamento durante 30s a 55°C, e extensão durante 30s a 72°C. Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94 °C) para ativação da enzima (Hot Start) e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72 °C).

### **2.5.3 Determinação das refeições sanguíneas pela amplificação de um segmento do citocromo *b* de exemplares capturados nas áreas estudadas: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil**

O marcador *cyt b* para detecção de fontes alimentares tem vantagens em relação a outros pois, dada a sua localização no genoma mitocondrial, não sofre recombinação. Para avaliação das fontes alimentares dos flebotomíneos provenientes da região do Alentejo e do Município de Volta Redonda, o DNA extraído a partir do lisado de fêmeas ingurgitadas, foi submetido à técnica de PCR utilizando os *primers* que amplificam o gene citocromo *b* (*cyt b*): 5' CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A 3' e 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' (Peña *et al.*, 2012). Estas reações ocorreram num volume final de 50 µL, de acordo com as condições de preparação da reação e programa de ciclagem anteriormente descritas.

### **2.5.4 Verificação dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose e hibridização por Dot Blot**

Os ensaios de eletroforese foram realizados numa cuba horizontal, em géis de agarose (*Seakem & NuSieve*, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 x 20 cm, e preparados em TBE (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, as alíquotas, com 10 µL do produto da PCR, foram misturadas com 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese correu durante 2h a 70V.

O peso molecular dos *amplicons* foi determinado através do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA *Ladder* – Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O gel foi

corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain* (Sigma®) e os resultados registados através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

Os produtos amplificados através de PCR para o alvo de *Leishmania* (kDNA), foram adicionalmente analisados por hibridização em fase sólida (Dot Blot). Assim, para cada amostra, os produtos foram submetidos a um processo de desnaturação que consistiu no aquecimento dos *amplicons* a 100°C durante 3 min de 10 µL, diluídos em 90 µL de água destilada, seguindo-se um rápido arrefecimento com gelo e junção de 13 µL de solução desnaturante (4 N NaOH contendo 25mM EDTA pH 8.0).

O material desnaturado foi adsorvido por vácuo moderado à membrana de nylon (Boehringer Mannheim, Germany), previamente humedecida em água destilada e acondicionada no aparelho Bio-Dot™ (BioRad, Hercules, CA, EUA). Após a adsorção dos *amplicons*, as áreas de aplicação da membrana foram tratadas com 100 µL de água destilada/poço, seguida de 100 µL de solução desnaturante/poço. Posteriormente, a membrana foi removida do Bio-Dot™, lavada 5 vezes durante 5 min em solução salina contendo citrato de sódio - SSC 2X e posteriormente seca à temperatura ambiente. Por último, o DNA foi fixado covalentemente à membrana por irradiação com luz UV num aparelho Stratalinker™, durante 2 min.

Para a reação de hibridização, as membranas contendo os DNAs foram tratadas durante 3 h, a 60 °C em solução de bovino, BLOTTO - *Bovine lacto transfer technique optimizer* (SSC 1,5X, 1% SDS, 0,5% de leite desnatado Mollico®), em forno de hibridização (Techne Inc, Princeton N.J./EUA). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução BLOTTO durante 16 h, a 56 °C com 25 pmol/µL de sonda específica para *Leishmania infantum*: 5' AAA AAT GGG TGC AGA AAT 3' (Francino *et al.*, 2006), marcada com biotina na extremidade 5'. Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas 5 vezes durante 5 min com tampão de lavagem (tampão salina ou *Phosphate buffered saline* PBS contendo 0,05% de Tween-20) à temperatura ambiente. De seguida, as membranas foram incubadas durante 1 h, a 25 °C) com o conjugado Streptavidina-Peroxidase (Sigma) diluído (1/1000) em tampão de lavagem. Após um novo ciclo de lavagem das membranas, a reação de hibridização foi revelada com kit de quimioluminescência (Santa Cruz, EUA) que aumenta a sensibilidade do ensaio em dez vezes, seguindo as especificações do fabricante.

### 2.5.5 Sequenciação dos segmentos de DNA

Os produtos amplificados, foram purificados utilizando o kit comercial *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE, Fairfield, Connecticut, EUA).

A sequenciação dos produtos amplificados, foi realizada pelo método de Sanger & Coulson (1975), na plataforma de sequenciamento RPT01A- PDTIS/Fiocruz (ABI 3730XL Applied Biosystem). Para a reação foi utilizado o kit de extração BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), utilizando a reação adaptada com 2 µL de DNA molde (5-20 ng), 1,88 µL de Tampão 5× (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 0,25 µL de BigDye e água Milli-Q qsp 5,37 µL. A ciclagem da reação consiste em 35 ciclos de 15s a 96°C seguido de 10s a 50 °C e por último 60°C durante 4 min. As amostras foram processadas na plataforma de sequenciamento e submetidas aos processos de precipitação e desnaturação da reação de sequenciação.

Após estes procedimentos, foi realizada uma pesquisa na base de dados *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando o algoritmo *Blast N* na base de dados de nucleotídeos NT. O *genbank* permite uma comparação extensa entre as sequências completas das espécies.

## 2.6 Análise de dados: Alentejo, Portugal, e Volta Redonda, Brasil

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 25. Numa primeira análise foram utilizados os testes de KolmogorovSmirnov e Shapiro-Wilk por forma a avaliar a normalidade dos dados. Dado que o pressuposto da normalidade dos dados não foi validado, isto é, não se verificou uma distribuição normal dos mesmos, foram utilizados testes não paramétricos, Mann-Whitney (MW) e Kruskal-Wallis (KW), para comparação dos valores das densidades das espécies flebotômicas, entre os anos de captura, distritos, tipo e variedade de biótopos, e de acordo com os animais presentes.

### 3 Resultados

#### 3.1 Número de exemplares capturados no Alentejo, Portugal, em 2016 e 2017, e espécies flebotomínicas identificadas morfológicamente

Nos dois Distritos estudados, nomeadamente Évora e Beja, Alentejo, no total dos dois anos consecutivos de prospeção, entre maio e novembro, e durante duas noites consecutivas por mês, capturaram-se 431 flebotomíneos, em biótopos domésticos e peridomésticos, dos quais, 35,03% (151/431) fêmeas e 64,97% (280/431) machos. Foram identificadas, para ambos os sexos, as cinco espécies assinaladas em Portugal, nomeadamente *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta*. Em ambos os anos de captura, o número de machos foi superior ao número de fêmeas. O Quadro 6 apresenta o número total de exemplares capturados, por espécie e por sexo.

Quadro 6 - Número total de flebotomíneos, por espécie e por sexo, capturados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017

<b>Espécie</b>	<b>N ♂</b>	<b>N ♀</b>	<b>Total</b>
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	148	58	<b>206</b>
<i>Phlebotomus ariasi</i>	7	4	<b>11</b>
<i>Phlebotomus sergenti</i>	49	6	<b>55</b>
<i>Phlebotomus papatasi</i>	3	1	<b>4</b>
<i>Sergentomyia minuta</i>	73	82	<b>155</b>
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>151</b>	<b>431</b>

N = número de exemplares capturados

#### 3.2 Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas no Alentejo, 2016 e 2017

No conjunto dos dois anos de capturas, nos Distritos de Évora e Beja, a abundância relativa das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, foi, por ordem decrescente, a seguinte: 47,80% (206/431) *P. perniciosus*, 35,96% (155/431) *S. minuta*,

12,76% (55/431) *P. sergenti*, 2,55% (11/431) *P. ariasi* e, por último, *P. papatasi* 0,93% (4/431) (Fig. 57).

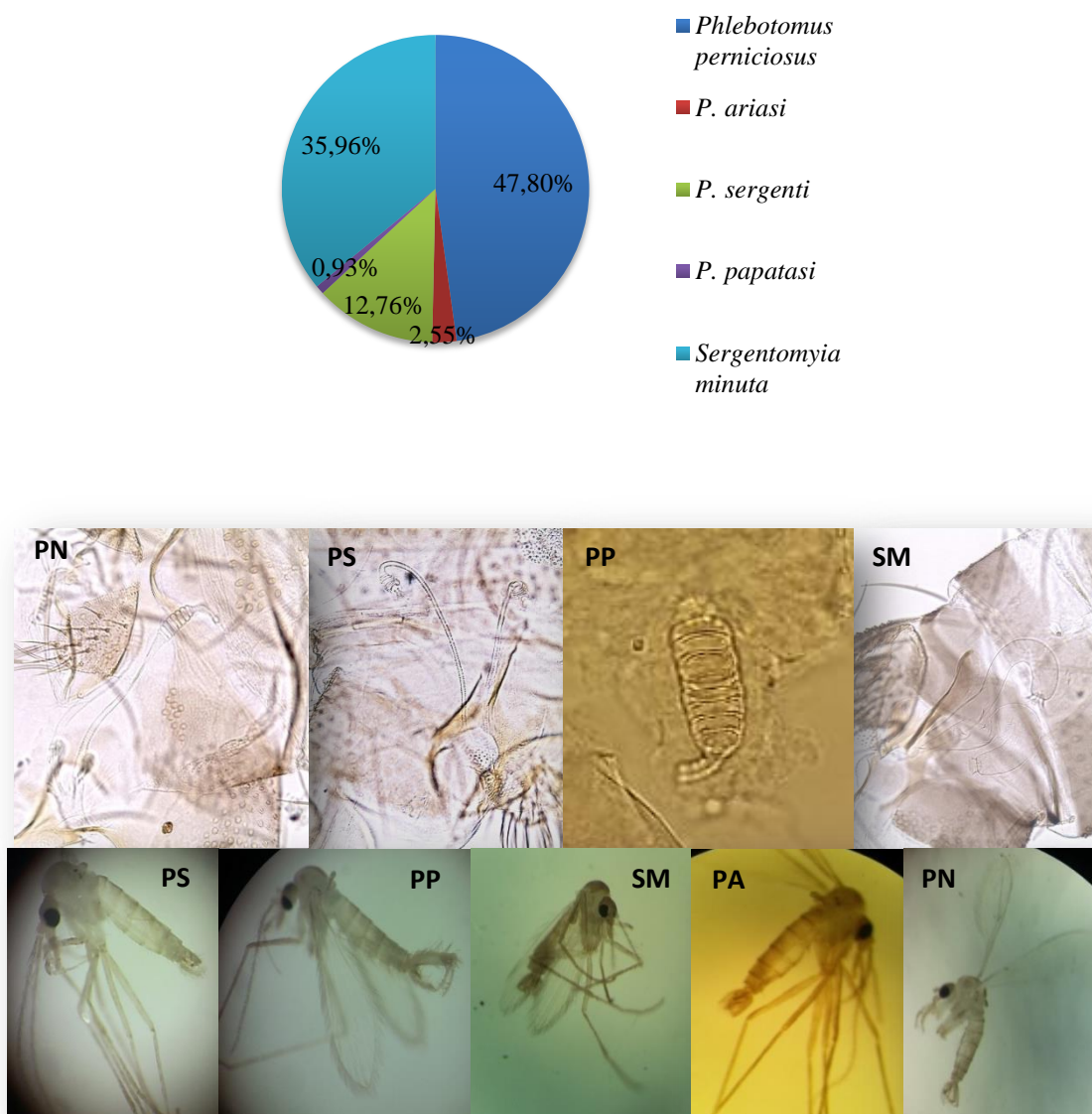


Fig. 57 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas, de maio a novembro de 2016 e 2017, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal e fotografias, ao microscópio ótico, das espermatecas e das genitálias externas das espécies *Phlebotomus perniciosus* (PN), *P. ariasi* (PA), *P. sergenti* (PS), *P. papatasi* (PP) e *Sergentomyia minuta* (SM)

Relativamente à abundância relativa das espécies, em cada ano de captura, em 2016, as espécies mais abundantes foram *P. perniciosus* 34,23% (51/149) e *P. sergenti* 33,56% (50/149), e a menos abundante *P. ariasi* 1,34% (2/149). Em 2017, a espécie mais abundante foi *P. perniciosus* 55,32% (156/282), seguida de *S. minuta* 38,30%

(108/282), e a menos abundante *P. papatasi*. Sem contar com *P. papatasi*, *P. sergenti* foi menos abundante (1,77%) em relação a 2016 (Fig. 58). O número total de flebotomíneos capturados em 2016 foi 149 e em 2017, 282.

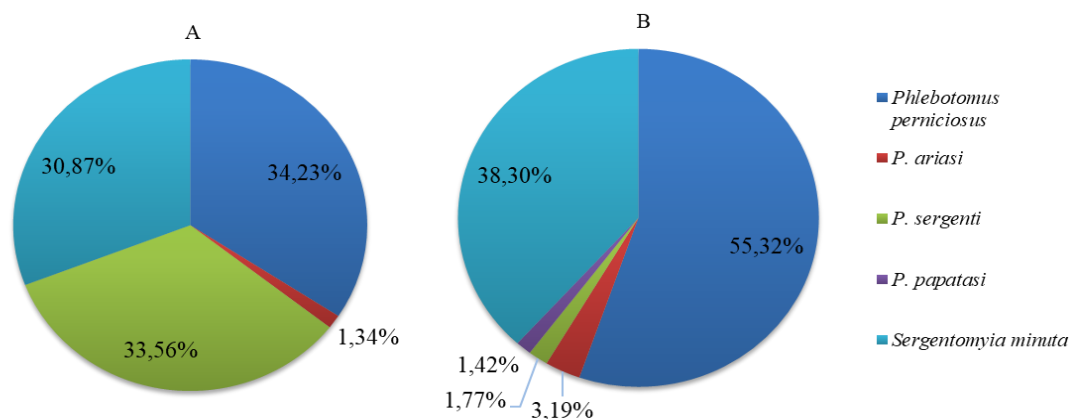


Figura 58 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas, de maio a novembro, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, em 2016 (A) e em 2017 (B)

Em relação à abundância relativa das espécies, por sexo (Fig. 59), *S. minuta* foi a mais abundante para fêmeas 54,30% (82/151), seguida de *P. perniciosus* 38,41% (58/151). Para os machos, a espécie mais abundante foi *P. perniciosus* 52,86% (148/280), seguida de *S. minuta* 26,07% (73/280).

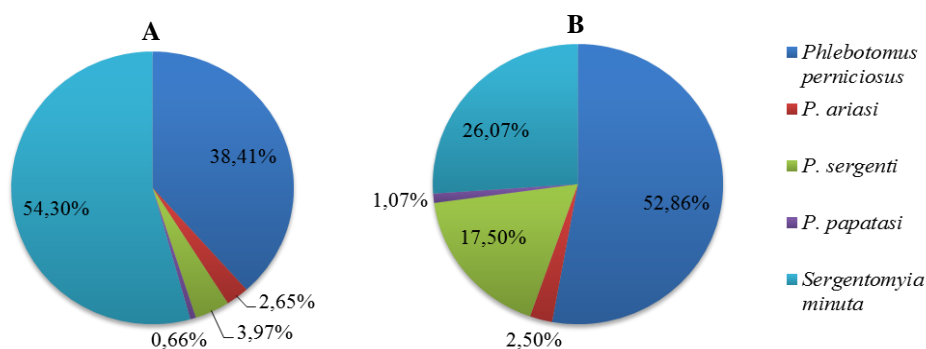


Fig. 59 - Abundância relativa das espécies flebotomínicas, capturadas em 2016 e 2017 nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, para fêmeas (A) e para machos (B)

### 3.2.1 Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas, por Distrito, no Alentejo, 2016 e 2017

A espécie *P. perniciosus* foi a mais abundante, nos dois anos de captura, em ambos os Distritos. No entanto, em Beja a abundância relativa desta espécie foi superior, quando comparada com o Distrito de Évora: 62,66% (99/158) Vs. 39,19% (107/273). Tal como se pode verificar na figura 60, a espécie *P. sergenti* foi mais abundante no Distrito de Évora, sendo o valor da abundância neste Distrito, cerca de seis vezes mais do que se observou no Distrito de Beja. A espécie *P. papatasi* só foi capturada no Distrito Évora (Fig. 60).

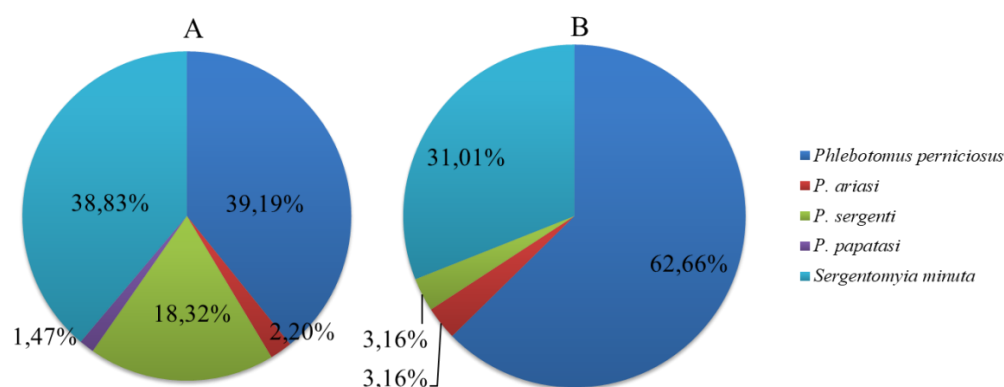


Fig. 60 - Abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas nos Distritos de Évora (A) e Beja (B), em 2016 e 2017

### 3.3 Concelhos, freguesias, localidades, tipos e variedades de biótopos prospetados, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, 2016 e 2017

Através de 178 armadilhas colocadas nos Distritos de Évora e Beja, foram realizadas capturas em 13 dos 28 concelhos (46,43%), abrangendo 19 freguesias e 19 localidades (Fig. 61).

No Distrito de Évora foram colocadas 51,12% (91/178) das armadilhas utilizadas e 48,88% (87/178) no Distrito de Beja. Verificou-se a presença de pelo menos uma espécie flebotomínica em 14 das localidades prospetadas, ou seja, 83,68% (14/19) das localidades foram positivas para a presença de flebotomíneos (Figs. 61, 62 e 63).



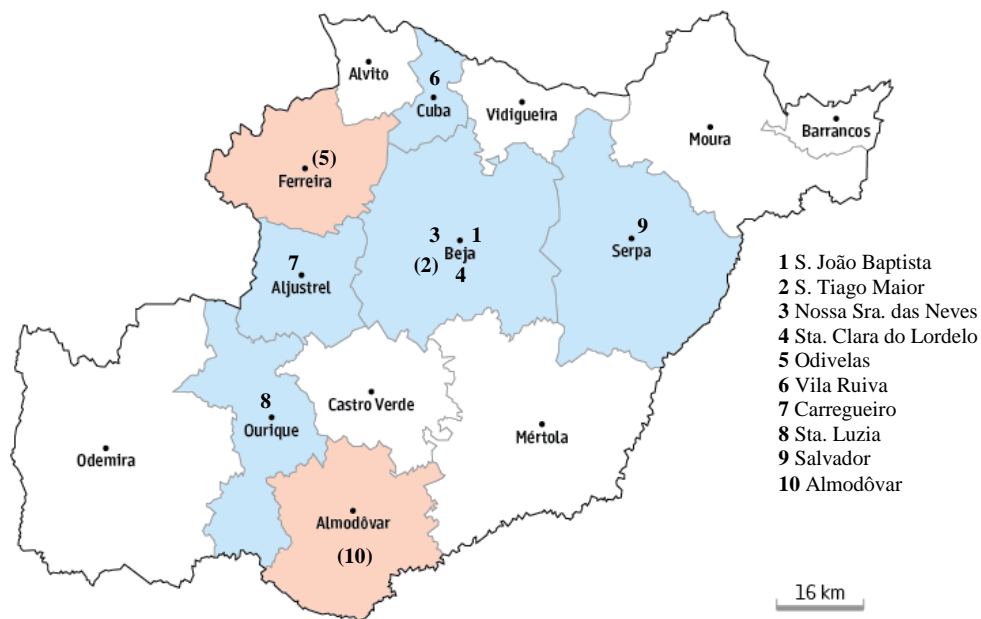


Fig. 63 - Localidades prospetadas, numeradas, por concelho, no Distrito de Beja, 2016 e 2017

A presença de *P. perniciosus* foi assinalada em todas as localidades positivas (14/19), sendo a espécie com maior abundância relativa e maior distribuição geográfica. A espécie *P. ariasi* foi assinalada em 35,71% (5/14) das localidades positivas. Na localidade de S. Pedro, concelho de Alandroal, Distrito de Évora, foram assinaladas as cinco espécies flebotomínicas conhecidas em Portugal, sendo esta a única localidade onde se assinalou a espécie *P. papatasi*, ainda rara em Portugal (Fig. 64 e 65).

EVORA

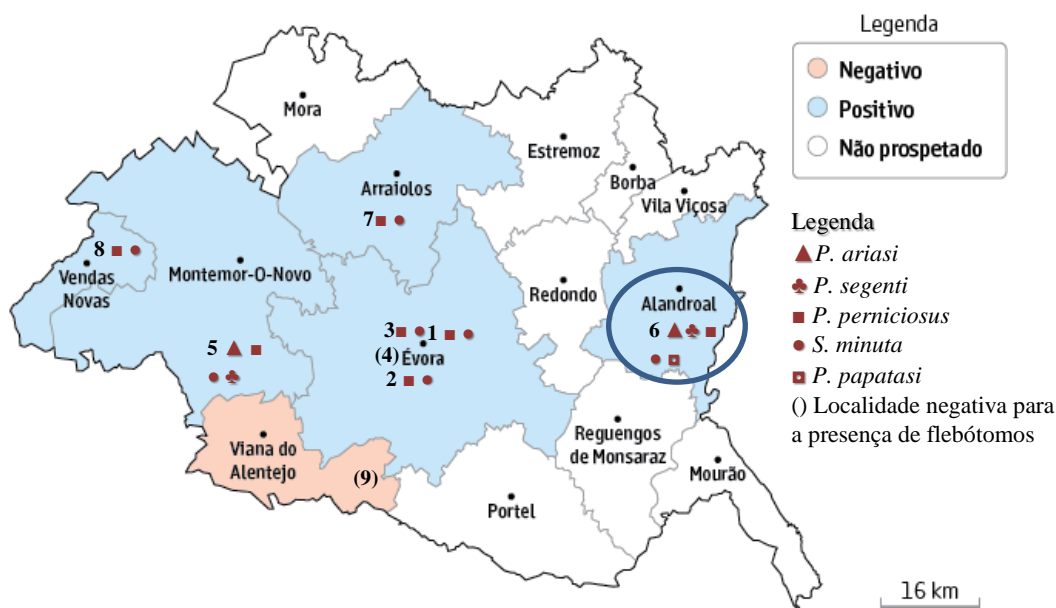


Fig. 64 - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade (número), no Distrito de Évora, 2016 e 2017. Assinalado, com um círculo, o concelho do Alandroal: capturadas as cinco espécies flebotomínicas

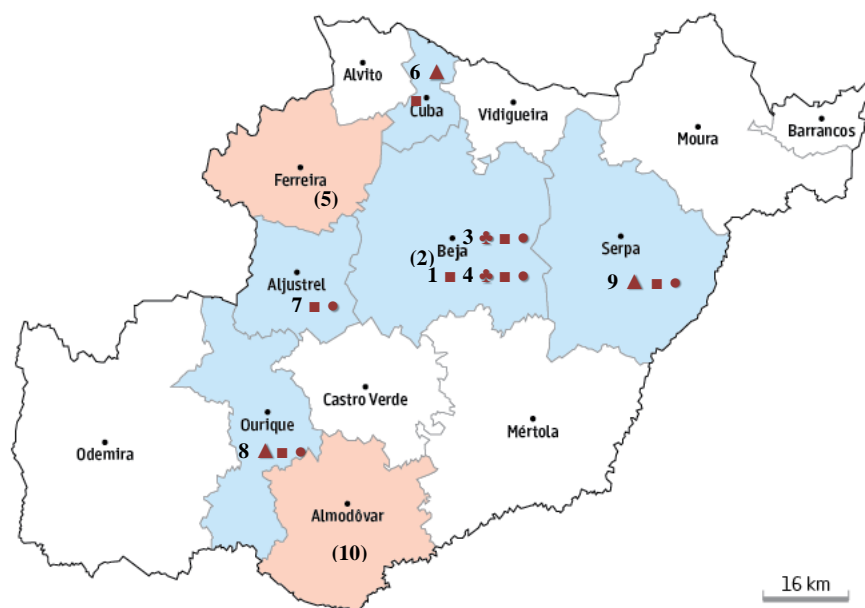


Fig. 65 - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade (número), no Distrito de Beja, 2016 e 2017

Nas várias localidades e biótopos prospetados, o número de flebotomos e espécies capturados variou. O número máximo de flebotomos capturados foi 66, num biótopo peridoméstico do Distrito de Évora. A maior diversidade de espécies observada

foi num biótopo peridoméstico, variedade muro, onde foram assinaladas as espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi* e *S. minuta* (Quadro 7).

Quadro 7 - Concelhos, freguesias, coordenadas das localidades prospetadas e espécies flebotomínicas capturadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017

D	Concelho	Freguesia	N	Localidade	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Espécies flebotomínicas				
								PN	PA	PS	PP	SM
Évora	Évora	N. Sra. Saúde	1	Canaviais	38°36'50"	7°54'03"	236	+	-	-	-	+
		Horta das Figueiras	2	Torregela	8° 32' 42"	7°54' 20"	295	+	-	-	-	+
		N. Sra. Graça Divor	3	Monte da Oliveirinha	38°27'53"	7°30'51"	250	+	-	-	-	+
		Tapada da Mata	4	Malagueira	38° 33' 09"	7°58'11"	303	-	-	-	-	-
	Montemor	S. Tiago Escoural	5	Escoural	38° 32' 23"	8° 09' 56"	326	+	+	+	-	+
	<b>Alandroal</b>	<b>Terena</b>	<b>6</b>	<b>S. Pedro</b>	<b>38° 63' 23"</b>	<b>7° 40' 65 "</b>	<b>231</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
	Arraiolos	Arraiolos	7	Couto do Caçador	38° 72' 23"	7° 98' 55"	337	+	-	-	-	+
	V. Novas	Landeira	8	Jardim da Landeira	38° 59' 45"	8° 64' 65"	172	+	-	-	-	+
	Viana do Alentejo	S. Bartolomeu do Outeiro	9	S. Bartolomeu do Outeiro	38°19'56"	8°00'05"	215	-	-	-	-	-
Beja	Beja	S. João Baptista	1	Monte das Beatas	37°59'28"	7°49'40"	170	+	-	-	-	-
		S. Tiago Maior	2	Falcões	38°00'18"	7°31'16"	265	-	-	-	-	-
		N. Sra. das Neves	3	Monte dos Ourives	37°59'15"	7°47'44"	254	+	-	+	-	+
		Sta. Clara Lordelo	4	Monte Rei Cid	37° 98'77"	7° 79' 56"	258	+	-	+	-	+
	Ferreira Alentejo	Odivelas	5	Forno Cal	38°10'14"	8°8'51"	132	-	-	-	-	-
	Cuba	Vila Ruiva	6	Albergaria dos Fusos	39° 28' 46"	8° 93' 38"	278	+	+	-	-	-
	Aljustrel	Carregueiro	7	Monte dos Poços	37°48'48"	8°06' 04"	247	+	-	-	-	+
	Ourique	Sta. Luzia	8	Monte dos Bastos	37°72'23"	8°41'55"	250	+	+	-	-	+
	Serpa	Salvador	9	Monte da Morena	37°93'82"	7°61'97"	243	+	+	-	-	+
Almodôvar	Almodôvar	10	Monte do Beato	35°55'29"	8° 06'09"	343	-	-	-	-	-	

D - Distrito; N - número de freguesias/localidades prospetadas, por concelho (PN - *P. perniciosus*; PS - *P. sergenti*; PA - *P. ariasi*; PP - *P. papatasi*; SM - *S. minuta*)

### 3.4 Fêmeas flebotomínicas capturadas, por armadilha CDC, grávidas ou ingurgitadas, nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017

Das 151 fêmeas capturadas, 6,62% (10/151) estavam grávidas e pertenciam a duas espécies. *P. perniciosus* foi a espécie que apresentou maior número de fêmeas grávidas, 8 exemplares (5,30%), seguida de *S. minuta*, com 2 exemplares (1,32%).

Em 2016, foi capturada uma fêmea grávida da espécie *P. perniciosus*, no mês de julho, na localidade de Escoural, Évora, e no mês de agosto, foram capturadas duas fêmeas, uma *P. perniciosus* e outra *S. minuta*, na localidade de Canaviais, Évora. Em 2017, três fêmeas *P. perniciosus* e uma fêmea *S. minuta* foram capturadas grávidas, durante o mês de julho, na localidade de S. Pedro, Évora. Durante o mês de agosto, na localidade Monte da Morena, Beja, foram capturadas três fêmeas grávidas *P. perniciosus*. As capturas de fêmeas grávidas decorreram em biótopos domésticos e peridomésticos, nomeadamente armazéns exteriores, muros, abrigos animais e árvores de fruto (figueira) (Fig. 66). Nos dois anos, a captura da primeira fêmea grávida deu-se no mês de julho, no Distrito de Évora.



Fig. 66 - **A** - Biótopo peridoméstico, variedade muro, onde foi capturada uma fêmea *P. perniciosus* grávida, 2016, Évora. Assinalada, com uma seta, uma armadilha CDC; **B** - Biótopo doméstico, variedade armazém, onde foram capturadas três fêmeas grávidas *P. perniciosus*, 2017, Beja (Fotografias S. Pereira, 2016, 2017)

Em relação ao total de fêmeas capturadas em 2016 e 2017, 13,25% (21/151) estavam ingurgitadas, total ou parcialmente, pertencendo a quatro espécies. A espécie com maior percentagem de fêmeas alimentadas foi *P. perniciosus* 85,71% (18/21) e uma alimentada (4,76%) de cada uma das seguintes espécies: *P. ariasi*, *P. papatasi* e *S. minuta*.

Em 2016, das 41 fêmeas capturadas nos dois Distritos, seis (14,63%) estavam ingurgitadas, total ou parcialmente e com sangue vermelho “vivo”, ou vermelho escuro, aquando da observação ao estereomicroscópio e ao microscópio ótico para a identificação da espécie. Destas seis fêmeas, quatro pertencem à espécie *P. perniciosus* (9,76%), uma à espécie *P. ariasi*, e outra *S. minuta* (2,49%). A primeira fêmea

alimentada, *P. perniciosus*, foi capturada no mês de junho, na localidade Monte das Beatas, Beja, num biótopo peridoméstico. Em julho, foram capturadas três fêmeas ingurgitadas, duas *P. perniciosus* e uma *P. ariasi*, na localidade de Escoural, Évora, num biótopo doméstico, variedade armazém. Durante o mês de agosto, foi capturada uma fêmea *P. perniciosus* e uma *S. minuta*, num canil (Quadro 8).

Em 2017, das 110 fêmeas capturadas, nos dois Distritos, 15 (13,64%) estavam ingurgitadas. Destes exemplares, 14 eram *P. perniciosus* (12,73%) e uma *P. papatasi* (0,91%), tendo sido capturadas durante os meses de junho, julho e agosto. Tal como no ano de 2016, foram capturadas em biótopos domésticos e peridomésticos, em ambos os Distritos. Na localidade Monte dos Bastos, Beja, três fêmeas ingurgitadas foram capturadas num biótopo peridoméstico, variedade poço. Na localidade Couto do Caçador, Évora, uma fêmea ingurgitada foi capturada num biótopo peridoméstico, variedade armazém. Na localidade de S. Pedro, Évora, três fêmeas foram capturadas num biótopo peridoméstico, variedade armazém e outra também num biótopo peridoméstico, variedade abrigo de lenha. Na mesma localidade, mas num abrigo animal, foi capturada a única fêmea ingurgitada da espécie *P. papatasi* (Fig. 67). Na localidade Monte da Morena, Beja, foram capturadas mais seis fêmeas alimentadas em biótopos domésticos, duas na variedade parede da habitação humana e quatro em armazéns (Quadro 8).

Quadro 8 - Fêmeas flebotomínicas capturadas ingurgitadas, por mês, ano, Distrito, localidade, tipo e variedade de biótopo. As cores assinalam as diferentes variedades de biótopos

Espécie flebotomínica	Mês/ano	Distrito	Localidade	Tipo de biótopo	Variedade de biótopo
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2016	Beja	Monte das Beatas	Peridoméstico	Quintal
<i>P. ariasi</i>	Julho/2016	Évora	Escoural	Doméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2016	Évora	Escoural	Doméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2016	Évora	Escoural	Doméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2016	Évora	Canaviais	Peridoméstico	Canil
<i>S. minuta</i>	Agosto/2016	Évora	Canaviais	Peridoméstico	Canil
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2017	Beja	Monte dos Bastos	Peridoméstico	Poço
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2017	Beja	Monte dos Bastos	Peridoméstico	Poço
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2017	Beja	Monte dos Bastos	Peridoméstico	Poço
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2017	Évora	Couto do Caçador	Peridoméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Junho/2017	Évora	Couto do Caçador	Peridoméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2017	Évora	S. Pedro	Peridoméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2017	Évora	S. Pedro	Peridoméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2017	Évora	S. Pedro	Peridoméstico	Armazém
<i>P. perniciosus</i>	Julho/2017	Évora	S. Pedro	Peridoméstico	Abrigo de lenha
<i>P. papatasi</i>	Julho/2017	Évora	S. Pedro	Peridoméstico	Curral de veados
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2017	Beja	Monte da Morena	Doméstico	Parede habitação humana
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2017	Beja	Monte da Morena	Doméstico	Parede habitação humana
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2017	Beja	Monte da Morena	Doméstico	Parede habitação humana
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2017	Beja	Monte da Morena	Doméstico	Parede habitação humana
<i>P. perniciosus</i>	Agosto/2017	Beja	Monte da Morena	Doméstico	Parede habitação humana



Fig. 67 - Dois aspetos da variedade de biótopo onde foi capturada uma fêmea *P. papatasi* ingurgitada. **A** - Curral de veados; **B** - Palha para os mesmos (Fotografia S. Pereira, 2017)

As fêmeas alimentadas foram capturadas em variados biótopos domésticos e peridomésticos. As fêmeas totalmente alimentadas (abdómen repleto de sangue) foram capturadas em biótopos mais abrigados, como armazéns. Tanto em 2016, como em 2017, a primeira fêmea capturada ingurgitada foi *P. perniciosus*, e ocorreu no mês de junho no Distrito de Beja. Todas as fêmeas ingurgitadas, após identificação morfológica da espécie, foram conservadas, em etanol, individualmente, para análise molecular da fonte alimentar (hospedeiro em que tinham realizado a refeição sanguínea) (ponto 3.10).

### 3.5 Grau da rotação da genitália externa dos flebotomíneos machos, capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017

Durante a identificação morfológica das espécies de flebotomíneos machos, verificou-se que, no total, 7,86% (22/280) apresentaram a genitália externa parcialmente rodada, ou não rodada. Com a genitália parcialmente rodada, foram observados sete *P. perniciosus*, sete *S. minuta* e seis *P. sergenti*. Os biótopos, onde estes flebotomíneos foram capturados, eram do tipo doméstico e peridoméstico, de diferentes variedades, nomeadamente muros com fendas, armazéns, e troncos e folhas de árvores, que poderão ter funcionado como abrigo e/ou local de eclosão. Um *P. ariasi*, capturado em 2017, no Distrito de Beja, num biótopo peridoméstico, variedade muro, foi observado com a genitália não rodada (Fig. 68).

Em todos os exemplares observados, machos e fêmeas, não se identificaram anomalias quer nas genitálias externas dos machos, quer nas espermatecas das fêmeas.



Fig. 68 **A** - *P. papatasi* macho com a genitália externa com rotação completa; **B** - *P. ariasi* macho, com a genitália externa não rodada (observação ao estereomicroscópio) (Fotografia S. Pereira, 2017)

### 3.6 Razão dos sexos, por espécie flebotomínica, dos exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017

A razão dos sexos, para o total das espécies capturadas, foi de 1,85:1 (280/151), ou seja 1,85 machos para cada fêmea. Para cada espécie, a razão entre machos e fêmeas, por ordem decrescente foi a seguinte: *P. sergenti* 8,17:1, *P. papatasi* 3:1, *P. perniciosus* 2,55:1, *P. ariasi* 1,75:1, e *S. minuta* 0,89:1. Verificou-se uma predominância dos machos sobre as fêmeas, em particular para *P. sergenti*, e uma inversão desta razão para *S. minuta*. Em 2016, no total, verificou-se uma razão de 2,63:1 (108/41), superior ao ano de 2017, onde esta razão foi de 1,56:1 (172/110).

### 3.7 Infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não *Leishmania* sp.

Durante a identificação morfológica das espécies flebotomínicas, foi detetado um macho da espécie *P. sergenti* com ectoparasitas (ácaros) na região da genitália externa (Fig. 69). Este exemplar foi capturado em julho de 2016, num biótopo doméstico, variedade armazém. A taxa de infestação para esta espécie foi de 2,04% (1/49) e a taxa de infestação para o total de flebótomos capturados foi de 0,65% (1/280).

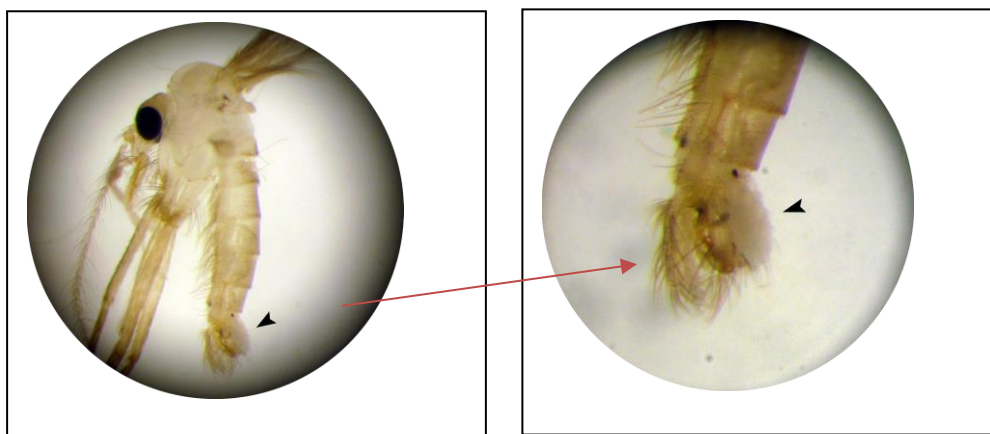


Fig. 69 - Exemplar macho de *Phlebotomus sergenti* com um ácaro na genitália externa, assinalado por uma seta preta (Fotografia A. Pereira, 2016).

Não foram identificadas fêmeas parasitadas por endoparasitas não *Leishmania* sp., nomeadamente nemátodos, durante a observação das espermatecas ao microscópio ótico.

### **3.8 Densidade flebotomínica, variação sazonal das espécies, e tipos e variedades de biótopos prospetados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, 2016 e 2017**

A densidade flebotomínica, por espécie e por meses de captura, comuns aos dois anos, está representada na figura 70/Quadro 9. A densidade total mais elevada foi registada no mês de julho, com 6,78 flebótomos/armadilha CDC, noite. Tendo em conta a densidade flebotomínica nos restantes meses, considera-se que há uma tendência monofásica, com um pico no referido mês. A espécie com densidade mais elevada, ao longo dos meses, foi *P. perniciosus*, sendo a densidade média desta espécie de 0,94 flebótomos/armadilha CDC, noite. O valor mínimo observado para esta espécie foi 0,04, em outubro, e o valor máximo 2,73 em julho. A espécie com a segunda maior densidade foi *S. minuta* que atingiu 2,46, no mês de julho. A temperatura média mais elevada foi registada no mês de julho (27,55°C), seguida do mês de junho (27,45°C), enquanto a humidade relativa foi mais elevada nos meses de novembro (55,98%) e maio (51,38%). A velocidade do vento foi nula, exceto para os meses de junho e julho, onde se registou uma velocidade muito baixa de 0,3m/s e 0,2m/s respetivamente.

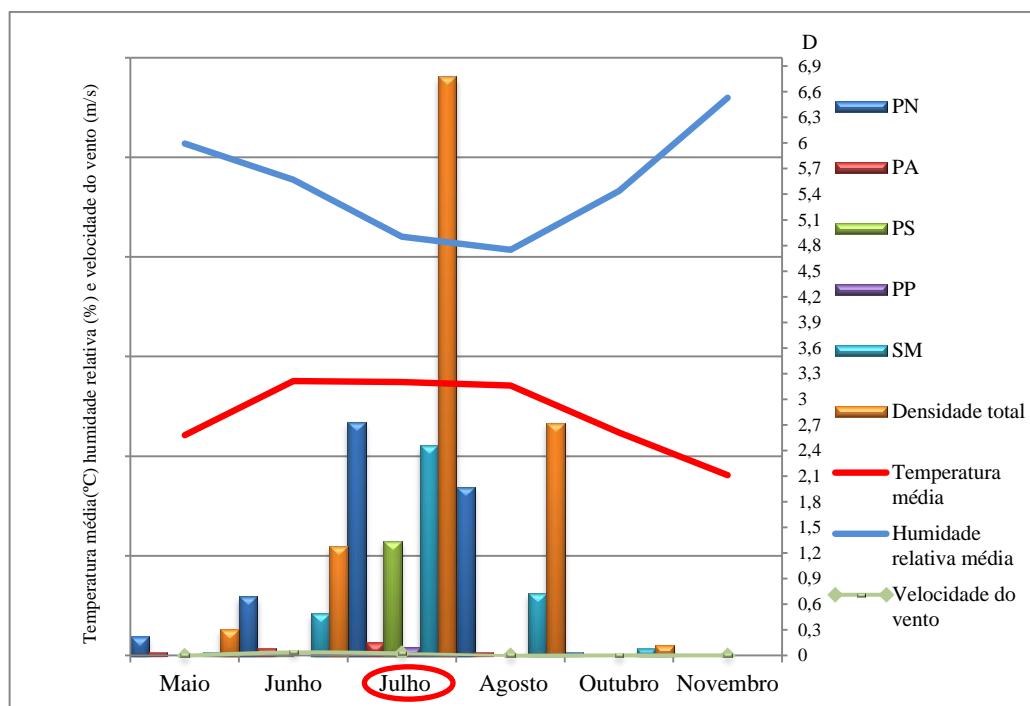


Fig. 70 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura, comuns nos anos de 2016 e 2017. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média no Distrito de Évora e Beja (PN - *P. perniciosus*; PS - *P. sergenti*; PA - *P. ariasi*; PP - *P. papatasi*; SM - *S. minuta*; D - Densidade)

Quadro 9 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2016 e 2017

	Maio	Junho	Julho	Agosto	Outubro	Novembro
<i>P. perniciosus</i>	0,22	0,69	2,73	1,97	0,04	0
<i>P. ariasi</i>	0,04	0,08	0,15	0,03	0	0
<i>P. sergenti</i>	0	0,03	1,34	0	0	0
<i>P. papatasi</i>	0	0	0,1	0	0	0
<i>S. minuta</i>	0,04	0,49	2,46	0,72	0,08	0
<b>Densidade Total</b>	<b>0,3</b>	<b>1,28</b>	<b>6,78</b>	<b>2,72</b>	<b>0,12</b>	<b>0</b>
Temperatura média	22,1	27,55	27,45	27,1	22,35	18,1
Humidade média relativa	51,38	47,76	42,02	40,71	46,62	55,98
Velocidade do vento	0	0,3	0,2	0	0	0

Relativamente às densidades flebotomínicas, por cada ano de captura, em 2016, a densidade total mais elevada foi de 5,80, no mês de julho. *S. minuta* foi a espécie com densidade mais elevada (3), no mês de agosto, seguida de *P. sergenti* (2,45), no mês de julho. Neste ano, capturaram-se flebotomíneos, por armadilha CDC, a partir de junho até outubro. Em relação à temperatura média, de maio a novembro, observou-se um

pico no mês de junho (29,3°C) e outro no mês de agosto (29,6 °C). Para a humidade relativa, o valor máximo foi registado no mês de novembro (60,3%) e o valor mínimo no mês de agosto (37,4%) (Fig. 71; Quadro 10).

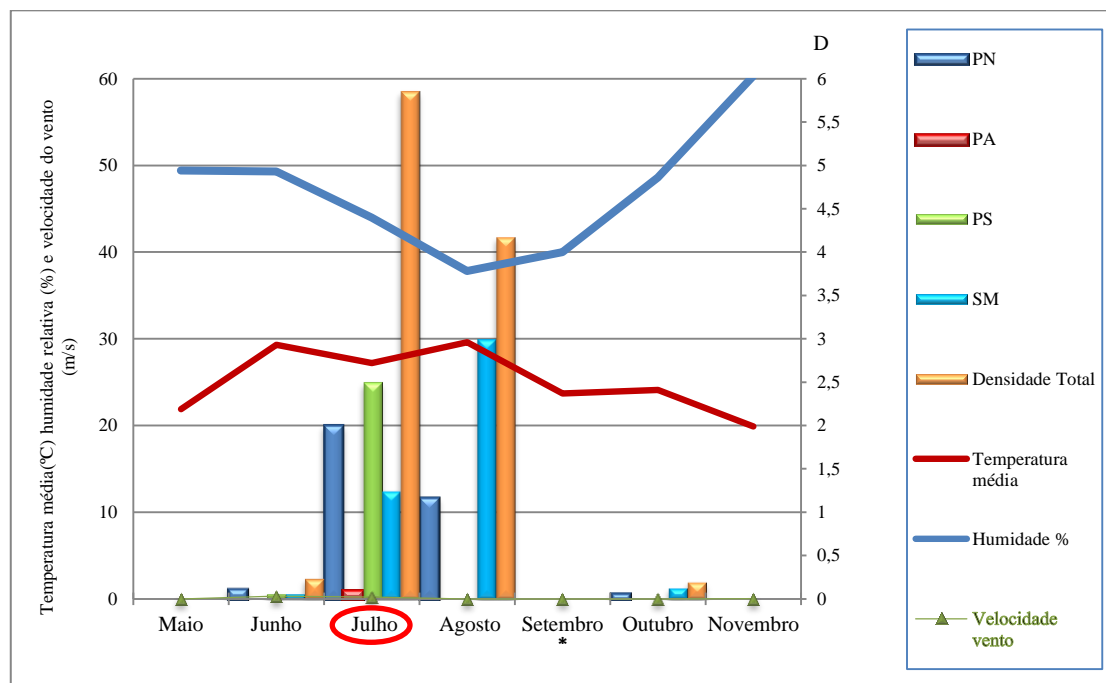


Fig. 71- Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura em 2016, nos Distritos de Évora e Beja. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média (PN - *P. perniciosus*; PS - *P. sergenti*; PA - *P. ariasi*; PP - *P. papatasi*; SM - *S. minuta*; D - Densidade; \*Não se efetuaram capturas – estágio na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil)

Quadro 10 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2016

	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
<i>P. perniciosus</i>	0	0,12	2	1,17	0	0,07	0
<i>P. ariasi</i>	0	0	0,1	0	0	0	0
<i>P. sergenti</i>	0	0,06	2,45	0	0	0	0
<i>S.minuta</i>	0	0,06	1,25	3	0	0,13	0
<b>Densidade Total</b>	0	0,24	5,80	4,17	0	0,2	0
Temperatura média	21,9	29,3	27,2	29,6	23,7	24,1	19,9
Humidade média relativa	49,4	49,3	44	37,8	40	48,6	60,3
Velocidade do vento	0	0,3	0,2	0	0	0	0,01

Em relação a 2017, a densidade total mais elevada foi igualmente no mês de julho com o valor de 7,67, ainda que superior à de 2016. *S. minuta* foi a espécie que

apresentou a densidade mais elevada, atingindo 3,62 no mês de julho superior ao valor atingido em 2016, seguida de *P. perniciosus*, com 3,43. Esta foi a espécie com densidades mais elevadas nos meses de junho e agosto. No mês de julho de 2017, foram capturadas as cinco espécies flebotomínicas conhecidas em Portugal. Verificou-se a ocorrência de espécies flebotomínicas de maio a setembro. A densidade flebotomínica total, em 2017, foi superior à de 2016, e as densidades das espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* também. A temperatura média mais elevada foi registada no mês de julho (27,7°C), seguida de junho (25,8°C). A humidade média relativa mais elevada foi registada em maio (53,36%) e a mais baixa em julho (40,05%) (Fig. 72; Quadro 11).

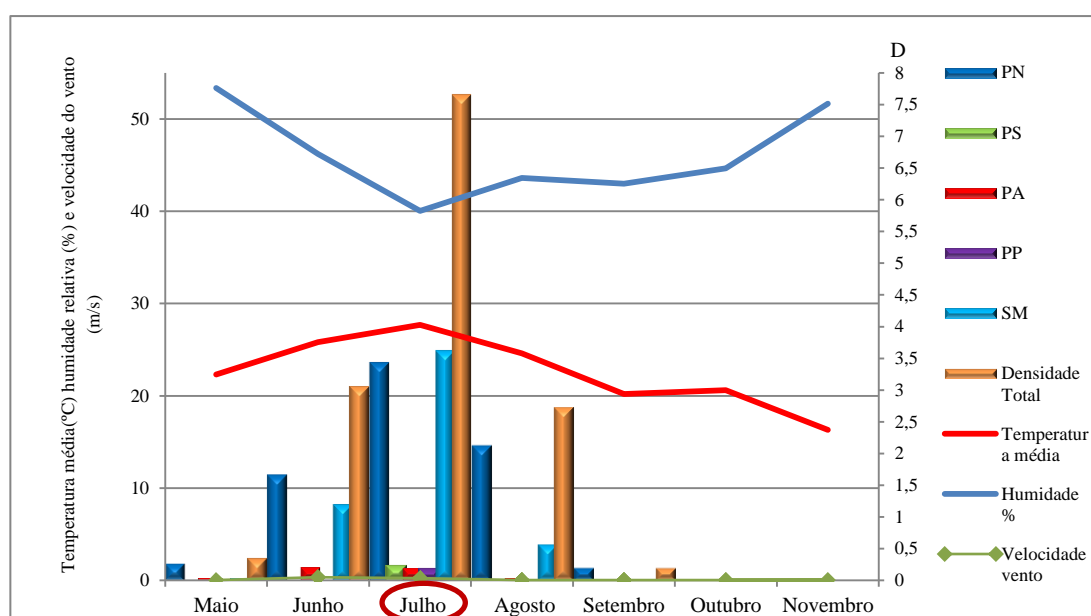


Fig. 72 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura, em 2017, nos Distritos de Évora e Beja. Temperatura média, humidade relativa média e velocidade do vento média (PN - *P. perniciosus*; PS - *P. sergenti*; PA - *P. ariasi*; PP- *P. papatasi*; SM - *S. minuta*; D - Densidade)

Quadro 11 - Densidade flebotomínica, por espécie, total, e por mês, nos Distritos de Évora e Beja, em 2017

	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
<i>P. perniciosus</i>	0,27	1,67	3,43	2,13	0,2	0	0
<i>P. ariasi</i>	0,045	0,2	0,19	0,04	0	0	0
<i>P. sergenti</i>	0	0	0,24	0	0	0	0
<i>P. papatasi</i>	0	0	0,19	0	0	0	0
<i>S. minuta</i>	0,045	1,2	3,62	0,57	0	0	0
<b>Densidade Total</b>	<b>0,36</b>	<b>3,07</b>	<b>7,67</b>	<b>2,74</b>	<b>0,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Temperatura média	22,3	25,8	27,7	24,6	20,2	20,6	16,3
Humidade %	53,36	46,22	40,05	43,62	43	44,65	51,67
Velocidade vento	0	0,3	0,2	0	0	0	0,01

### 3.8.1 Densidade flebotomínica por biótopo, doméstico e peridoméstico, das espécies capturadas em 2016 e 2017, Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal

Foram prospetadas 10 variedades de biótopos domésticos, tendo o número de flebotomíneos capturados variado entre 0 e 80. Das 10 variedades, 7 (70%) foram positivas para a presença de flebotomíneos. A densidade total, em biótopos domésticos, foi de 2,45, isto é, 2,45 flebotomíneos por armadilha CDC, noite. Os armazéns junto a habitação humana foram os biótopos com densidade mais elevada (8,00), seguidos das paredes das habitações humanas (5,00). As churrasqueiras, abrigos de botijas de gás e pátios foram os biótopos domésticos onde não se capturou nenhum flebotomíneo, sendo por isso a densidade 0 (Fig. 73; Quadro 12).

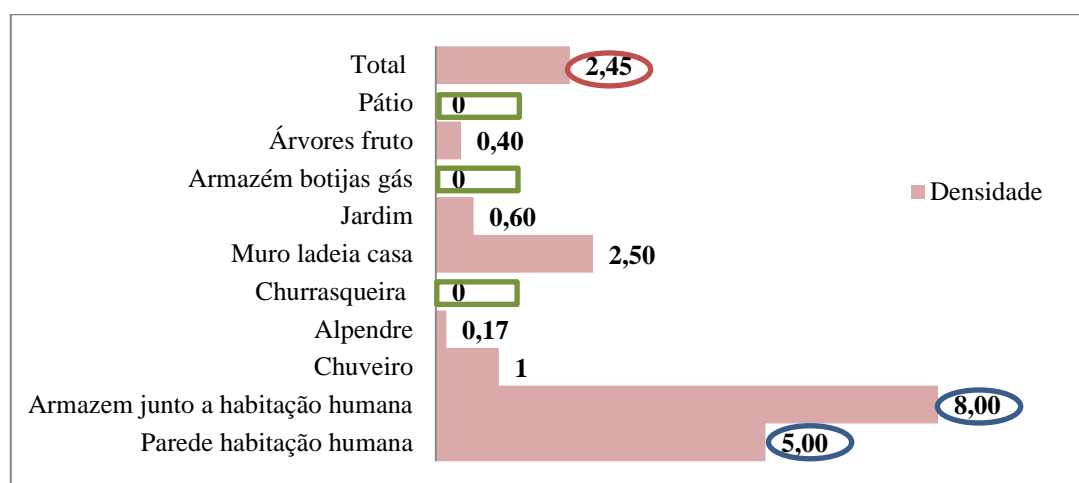


Fig. 73 - Densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos domésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal

Quadro 12 - Número de flebotomíneos capturados, número de CDC colocadas, densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos domésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo

Variedade de biótopos domésticos	Nº flebotomíneos	Nº CDC colocadas	Densidade
Armazém junto a habitação humana	80	10	8,00
Parede habitação humana	20	4	5,00
Chuveiro/piscina	3	3	1,00
Muro da casa	20	8	2,50
Árvores fruto	2	5	0,40
Jardim	3	5	0,60
Alpendre	2	12	0,17
Churrasqueira	0	4	0,00
Armazém botijas gás	0	1	0,00
Pátio	0	1	0,00
<b>Total</b>	130	53	2,45

Relativamente aos biótopos peridomésticos, foram prospetadas 24 variedades, das quais 83,33% (20/24) foram positivas para a presença de flebotomíneos. O número de flebotomíneos capturados variou entre 0 e 120. O curral de veados foi o biótopo que apresentou maior densidade flebotomínica (12,00), seguido das caixas de gravilha (8,00) e poço (7,25). Entre os biótopos com menor densidade, encontram-se as vinhas (0,50), os cercados (0,25), e as Mães de água (0,25). A densidade total dos biótopos peridomésticos foi de 2,45. Os biótopos peridomésticos com densidade nula foram as casas abandonadas, cavaliças, muros de madeira e caixas de estacas (Fig. 74; Quadro 13).

Dos dois tipos de biótopos (domésticos e peridomésticos) prospetados, verificou-se que as maiores densidades flebotomínicas foram observadas nos biótopos peridomésticos. A densidade flebotomínica total, por tipo de biótopo (doméstico/peridoméstico), foi igual nos dois anos de captura, ou seja, 2,45 flebotomíneos capturados por armadilha, noite.

A densidade flebotomínica total foi mais elevada nas seguintes variedades de biótopos: “armazém junto a habitação humana” - tipo doméstico:  $D = 8$ , e “curral de veados” - tipo peridoméstico:  $D = 12$

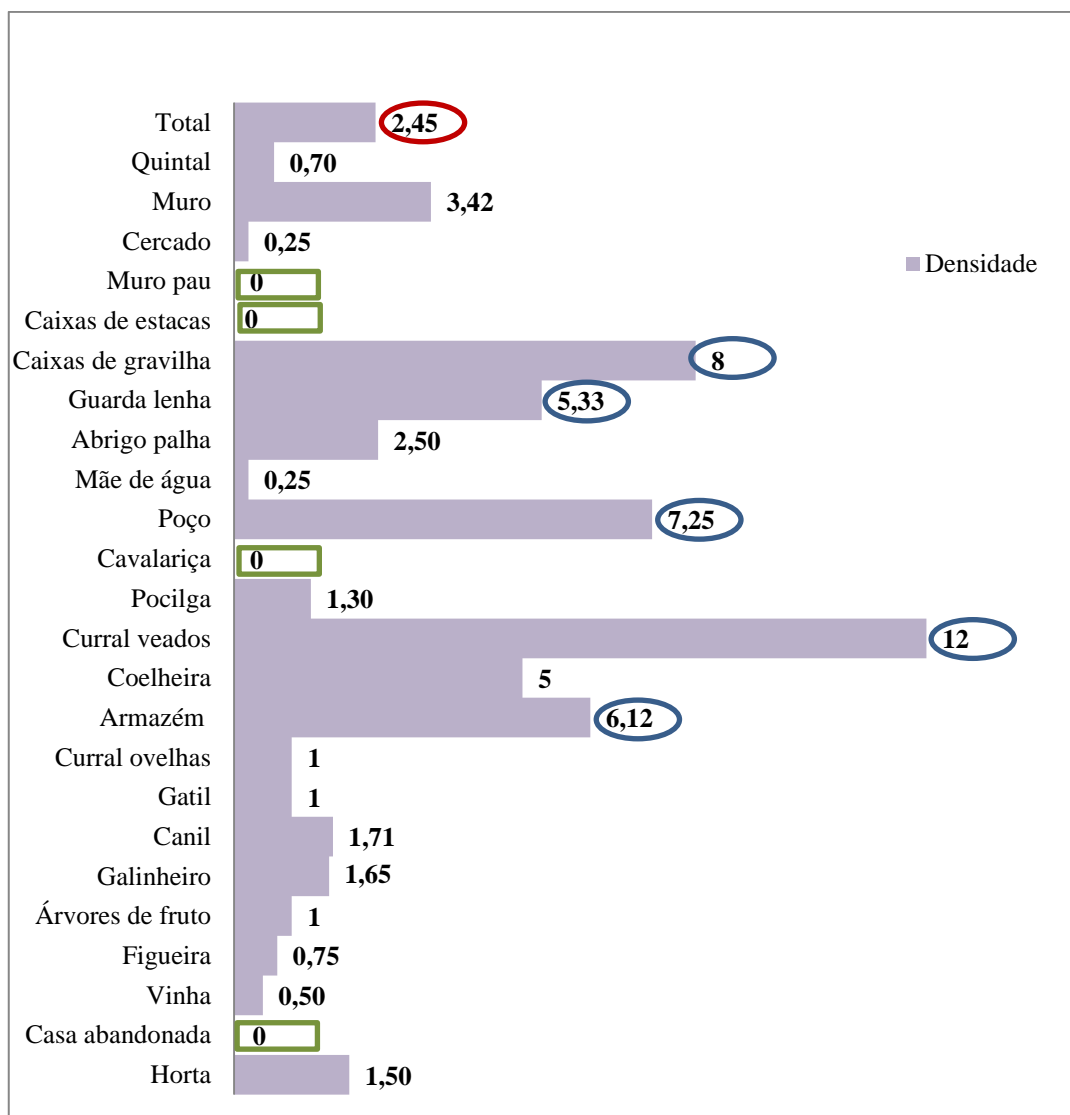


Fig. 74 - Densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos peridomésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal

Quadro 13 - Número de flebotomíneos capturados, número de CDC colocadas, e densidade flebotomínica total e por variedade de biótopos peridomésticos, prospetados em 2016 e 2017, Alentejo, Portugal

Variedade de biótopos peridomésticos	Nº flebotomíneos	Nº CDC colocadas	Densidade
Curral veados	12	1	12,00
Caixas de gravilha	8	1	8,00
Poço	29	4	7,25
Armazém (a ≥ 10m da habitação)	104	17	6,12
Coelheira	5	1	5,00
Guarda lenha	16	3	5,33
Muro (a ≥ 10m da habitação)	41	12	3,42
Abrigo palha	5	2	2,50
Canil	12	7	1,71
Galinheiro	28	17	1,65
Pocilga	8	6	1,30
Horta	6	3	1,50
Gatil	1	1	1,00
Curral ovelhas	3	3	1,00
Árvores de fruto (a ≥ 10m da habitação)	1	1	1,00
Figueira	3	4	0,75
Quintal	16	23	0,70
Vinha	1	2	0,50
Cercado	1	4	0,25
Mãe de água	1	4	0,25
Casa abandonada	0	2	0,00
Cavalariaça	0	2	0,00
Caixas de estacas	0	1	0,00
Muro madeira	0	2	0,00
<b>Total</b>	<b>301</b>	<b>123</b>	<b>2,45</b>

No que diz respeito a análise estatística dos resultados apresentados nos pontos anteriores, e relativamente à densidade flebotomínica, das diferentes espécies, e entre os dois anos de captura, Alentejo, Portugal, apenas se verificou uma diferença estatisticamente significativa para a espécie *P. sergenti*,  $p \leq 0,05$  (0,001), mais especificamente para os machos, tal como se pode verificar (Hypothesis Test Summary):

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of PS_f are the same across categories of Ano.	Independent-Samples Median Test	,625	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of PS_f is the same across categories of Ano.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,908	Retain the null hypothesis.
3	The medians of PS (F+M) are the same across categories of Ano.	Independent-Samples Median Test	,024	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of PS (F+M) is the same across categories of Ano.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,010	Reject the null hypothesis.

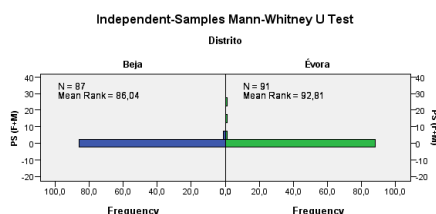
Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação às densidades flebotômicas entre os Distritos de Évora e Beja, exceto para *P. sergenti*:  $p \leq 0,05$  (0,036), que aparenta ter uma densidade superior no Distrito de Évora:

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of PS_f are the same across categories of Distrito.	Independent-Samples Median Test	,969	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of PS_f is the same across categories of Distrito.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,597	Retain the null hypothesis.
3	The medians of PS (F+M) are the same across categories of Distrito.	Independent-Samples Median Test	,073	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of PS (F+M) is the same across categories of Distrito.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,036	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.



Total N	178
Mann-Whitney U	4.259,500
Wilcoxon W	8.445,500
Test Statistic	4.259,500
Standard Error	143,405
Standardized Test Statistic	2,099
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,036

A análise estatística, quanto ao tipo de biótopos (doméstico e peridoméstico), mostrou que não existe uma diferença estatisticamente significativa. No entanto, ao analisar-se a densidade das fêmeas alimentadas (número de fêmeas alimentadas capturadas por armadilha, noite), verificou-se uma diferença significativa relativamente aos biótopos do tipo peridoméstico  $p \leq 0,05$  (0,027):

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of Grávida are the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Median Test	,451	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Grávida is the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,441	Retain the null hypothesis.
3	The medians of Alimentada are the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Median Test	,029	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of Alimentada is the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,027	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Ao realizar-se a análise por variedade de biótopo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para as espécies flebotomínicas, exceto para *S. minuta*, quer para as fêmeas  $p \leq 0,05$  (0,019), quer para o total de exemplares capturados desta espécie  $p \leq 0,05$  (0,025). Aplicando o teste para amostras emparelhadas (*Pairwise comparisons*), os jardins/pomares e armazéns, foram as variedades de biótopos que aparentam ter maior diferença:

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of SM_f are the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Median Test	,016	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of SM_f is the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,019	Reject the null hypothesis.
3	The medians of SM (F+M) are the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Median Test	,026	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of SM (F+M) is the same across categories of variedade Biotopo 2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,025	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

No que diz respeito à presença de animais, até 20 metros da armadilha colocada, pela análise através do teste de KW verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas em relação à densidade das diferentes espécies flebotomínicas  $p \leq 0,05$  (0,012):

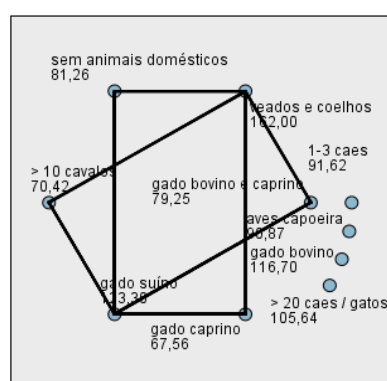
Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The medians of Total FLEBS are the same across categories of fauna_code.	Independent-Samples Median Test	,037	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of Total FLEBS is the same across categories of fauna_code.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,012	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

No entanto, a análise para as amostras emparelhadas não revelou diferenças significativas entre as variedades de biótopos:

Pairwise Comparisons of fauna\_code



### 3.9 Infecção flebotomínica por *Leishmania infantum*, em exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017

Todas as fêmeas flebotomínicas que não estavam ingurgitadas (124), e para identificação da infecção por *Leishmania*, foram submetidas a técnicas de biologia molecular (PCR multiplex) para amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* sp. (120 pb) e do gene cacophony de flebotomíneos (220 pb). Após esta análise, verificou-se que 4,03% (5/124) das fêmeas capturadas apresentaram uma banda referente a 120 pb, resultante da amplificação do DNA cinetoplastideial de *Leishmania infantum*, o que corresponde a uma infecção natural pela referida espécie de *Leishmania*, e sendo, então, a taxa de infecção flebotomínica total, para fêmeas não ingurgitadas, de 4,03%. (Figs. 75 e 76; Quadro 14). Para as restantes amostras de DNA, não se obtiveram amplificação, ou seja, os resultados foram considerados negativos.

Quadro 14 - Espécies flebotomínicas, naturalmente infetadas por *L. infantum*, capturadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017, por mês, concelho, freguesia, localidade, tipo e variedade de biótopo. As diferentes cores, por linha, assinalam as localidades onde as fêmeas foram capturadas infetadas

Mês/ano de captura	Distrito e Concelho	Freguesia	Localidade	Tipo de biótopo	Variedade de biótopo	Espécie flebotomínica
Julho/2016	Beja - Beja	N. Sra. das Neves	Monte dos Ourives	Peridoméstico	Armazém	<i>S. minuta</i>
Julho/2017	Évora-Alandroal	Terena	S. Pedro	Peridoméstico	Armazém	<i>S. minuta</i>
Julho/2017	Beja	N. Sra. das Neves	Monte do Rei Cid	Peridoméstico	Armazém	<i>S. minuta</i>
Agosto/2017	Beja - Serpa	Salvador	Monte da Morena	Doméstico	Armazém	<i>S. minuta</i>
Agosto/2017	Beja - Serpa	Salvador	Monte da Morena	Doméstico	Armazém	<i>P. perniciosus</i>

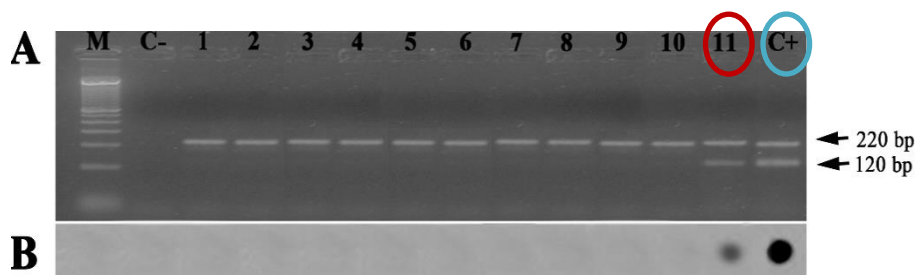


Fig. 75 - **11** - *S. minuta* positiva para *L. infantum*, infecção natural, Beja, 2016; C<sup>+</sup> - controlo positivo, formado por DNA de pool de insetos e promastigotas de *L. infantum*. Dot Blot PCR multiplex, tendo como alvo o fragmento de 220 pb referente ao gene cacophany (flebotomos) e 120 pb a partir do kDNA (*Leishmania* spp.); **A** - gel de agarose (2%); **M** - marcador 100 pb; **C**<sup>-</sup> - Controlo negativo da reação; **1 e 2** - DNA de flebotomíneos machos; **3 a 10** - DNA de fêmeas; **B** - Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*.

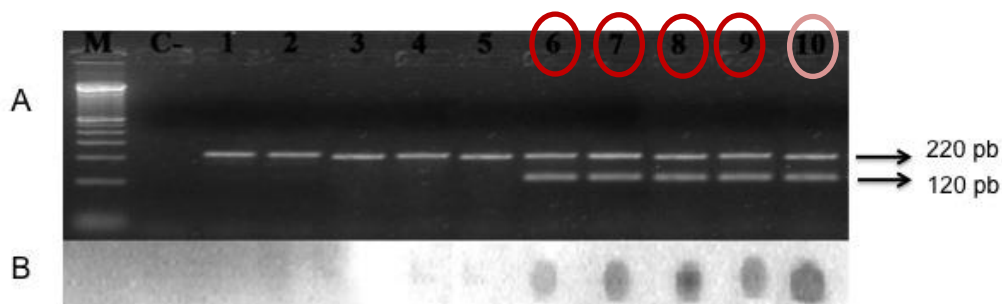


Fig. 76 - **6, 7, 8 e 9** amostras de *S. minuta*, e **10** amostra de *P. perniciosus*, positivas para infecção natural por *L. infantum*: diagnóstico molecular por Dot Blot PCR multiplex, tendo como alvo o fragmento de 220 pb referente ao gene cacophany (flebotomos) e 120 pb a partir do kDNA (*Leishmania* spp.); **A** - gel de agarose (2%); **M** - marcador 100 pb; **C**<sup>-</sup> - Controlo negativo da reação; **1 e 2** - DNA de machos; **3 a 9** - DNA de fêmeas; **B** - Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*.

Das cinco fêmeas com resultados positivos para infecção por *L. infantum*, quatro pertencem à espécie *S. minuta* e uma à espécie *P. perniciosus*, todas elas capturadas em biótopos da variedade armazém. Uma das fêmeas de *S. minuta* foi capturada no Distrito de Évora, concelho do Alandroal, num biótopo peridoméstico, variedade armazém, no ano de 2017. Duas outras fêmeas de *S. minuta* foram capturadas no Distrito de Beja, freguesia de N. Sra. das Neves, num armazém peridoméstico, do concelho de Beja, uma na localidade de Monte dos Ourives, capturada em 2016, e outra na localidade Monte do Rei Cid, capturada em 2017 (Fig. 77 A). Outra fêmea de *S. minuta* foi capturada, juntamente com uma fêmea de *P. perniciosus*, no concelho de Serpa, num biótopo doméstico, variedade armazém exterior, próximo a um canil, durante o mês de agosto do ano de 2017 (Fig. 77 B; Quadro 14).



Fig. 77 - Biótopos onde foram capturadas fêmeas naturalmente infetadas com *L. infantum*: **A** - biótopo peridoméstico, variedade armazém (Beja, 2017) **B** - biótopo doméstico, variedade armazém (neste biótopo, foram também capturadas três fêmeas grávidas - *P. perniciosus*) (Beja, 2017) (Fotografia S. Pereira, 2017)

### 3.10 Refeições sanguíneas das espécies flebotomínicas capturadas ingurgitadas, nos Distritos de Évora e Beja, Alentejo, Portugal, 2016 e 2017

Foram capturadas fêmeas ingurgitadas de *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *S. minuta* e *P. papatasi*, totalizando 27 exemplares. Em 2016, seis fêmeas estavam ingurgitadas, sendo 4 *P. perniciosus*, 1 *S. minuta* e 1 *P. ariasi*. Em 2017, 21 fêmeas estavam ingurgitadas, nomeadamente 19 *P. perniciosus*, 1 *S. minuta* e 1 *P. papatasi*.

Das fêmeas ingurgitadas, submetidas a análise de PCR para identificação das alimentações sanguíneas, apenas foi possível obter resultados da amplificação do segmento do *citocromo b* para oito fêmeas (40%), sete da espécie *P. perniciosus* e uma

de *S. minuta*. Contudo, só foram considerados positivos os resultados de cinco amostras de *P. perniciosus*, uma vez que duas apresentaram homologies e/ou taxa de cobertura muito baixas (Quadro 15).

Por análise comparativa das sequências do Genbank, com as sequências nucleotídicas do segmento do gene *cyt b* amplificadas, verificou-se que uma das fêmeas de *P. perniciosus* ingeriu sangue de uma perdiz *Bambusicola thoracicus* (nº acesso KM055786.1; 85% de homologia), duas alimentaram-se em roedores marsupiais *Marmosa murina* (nº acesso KT437773.1 e JF281067.1 com 85% e 95% de homologia respetivamente e outra alimentou-se em sangue humano (*Homo sapiens*) (nº acesso. KX697544.1 homologia de 97%). Relativamente à fêmea *S. minuta*, verificou-se que esta se tinha alimentado em sangue humano (*Homo sapiens*) (nº acesso. KY509039.1; 99% homologia). Os tipos e variedades de biótopos onde estas fêmeas foram capturadas são apresentados no Quadro 15.

Quadro 15 - Identificação da fonte das refeições sanguíneas das fêmeas flebotómicas capturadas ingurgitadas nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017. As cores, por linhas, assinalam o tipo de fonte alimentar

Espécie flebotómica	Fonte alimentar	Homologia	Nº de acesso	Completaridade	Distrito/Concelho	Tipo e variedade de biótopo	Animais presentes num raio de 30m (domésticos/silváticos)
<i>P. perniciosus</i>	<i>Bambusicola thoracicus</i>	85%	KM055786.1	98%	Évora/Montemor	Doméstico - Armazém	Cães, aves, pequenos roedores
<i>P. perniciosus</i>	<i>Marmosa murina</i>	85%	KT437773.1	82%	Évora/Montemor	Peridoméstico - Muro	Cães, aves, pequenos roedores
<i>P. perniciosus</i>	<i>Marmosa murina</i>	95%	JF281067.1	77%	Beja/ Serpa	Doméstico - Muro de habitação	Galinhas, cães, aves
<i>P. perniciosus</i>	<i>Homo sapiens</i>	97%	KX697544.1	98%	Beja/Ouriquue	Peridoméstico - Poço	Cães, gatos, ovelhas
<i>S. minuta</i>	<i>Homo sapiens</i>	99%	KY509039.1	98%	Évora/Évora	Peridoméstico - Canil	Cães, gatos, aves

Em todos os biótopos onde foram capturadas fêmeas ingurgitadas, exceto num, estavam presentes cães, num raio de 30m. Mesmo tendo sido efetuadas capturas em canis, não foram capturadas fêmeas alimentadas nestes animais.

### **3.11 Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas totais, de exemplares capturados nos Distritos de Évora e Beja, 2016 e 2017**

Nos meses de maio a novembro de 2016 e 2017, foram realizadas capturas em 34 noites de lua cheia e 67 em noites de lua nova. Verificou-se uma maior densidade flebotomínica total na fase de lua nova, sendo esta de 2,75. Na fase de lua cheia, a densidade flebotomínica total foi de 1,20.

### **3.12 Número de exemplares capturados no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em 2016, 2017 e 2018, e espécies flebotomínicas identificadas morfológicamente**

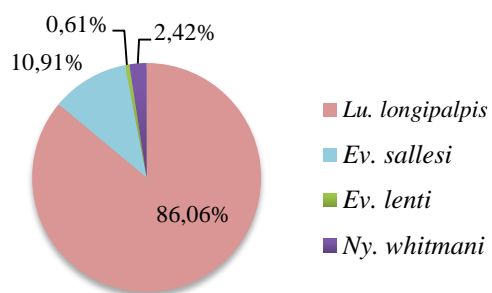
No Município de Volta Redonda, nos três anos de prospeções, e nos dezoito meses em que se realizaram capturas, no total, capturaram-se 165 flebotomíneos, de quatro espécies, nomeadamente *Lutzomyia longipalpis*, *Evandromyia sallesi*, *Nyssomyia whitmani* e *Evandromyia lenti*. Dos exemplares capturados, 14,55% (24/165) foram fêmeas e 85,45% (141/165) machos. Durante os meses de capturas, o número total de machos foi superior ao número total de fêmeas. Em 2016, realizaram-se três meses de capturas, em 2017, onze meses, e em 2018, quatro meses (Quadro 16).

Quadro 16 - Número total de flebotomíneos capturados por espécie, sexo, ano e mês, no Município de Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018

Ano/Mês		Nº flebotomos	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		<i>Evandromyia sallesi</i>		<i>Nyssomyia whitmani</i>		<i>Evandromyia lenti</i>	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
2016	Out	13	5	1	0	7	0	0	0	0
	Nov.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dez	3	0	0	1	1	1	0	0	0
2017	Fev.	23	20	2	0	0	0	1	0	0
	Mar	31	28	3	0	0	0	0	0	0
	Abr.	4	3	1	0	0	0	0	0	0
	Mai.	6	4	0	1	0	1	0	0	0
	Jun.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Jul.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ago	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Set	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Out	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nov.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dez	7	4	1	0	1	1	0	0	0	
2018	Jan	17	14	0	0	2	0	0	1	0
	Fev.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mar	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Abr.	59	53	1	2	3	0	0	0	0
<b>Total</b>		<b>165</b>	<b>133</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

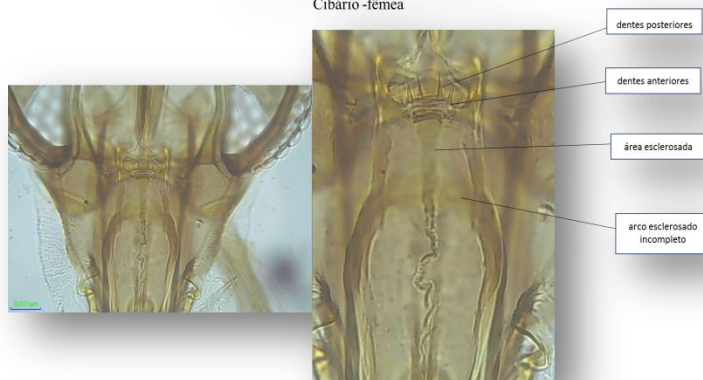
### 3.13 Abundância relativa das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas em Volta Redonda, Brasil, nos três anos de capturas, 2016, 2017 e 2018

A abundância relativa das espécies flebotomínicas capturadas em Volta Redonda, durante os 18 meses foi, por ordem decrescente, a seguinte: 86,06% (142/165) *Lu. longipalpis*, 10,91% (18/165) *Ev. sallesi*, 2,42% (4/165) *Ny. whitmani* e 0,60% (1/165) *Ev. lenti* (Fig. 78).



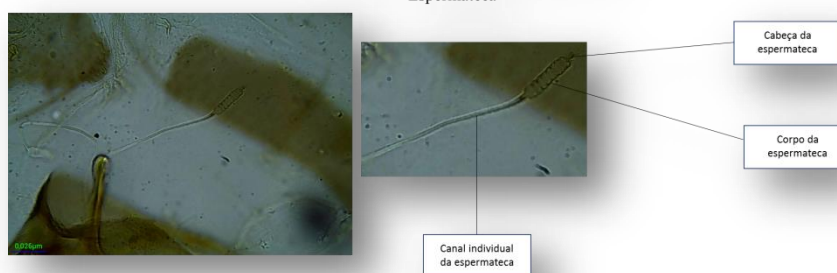
*Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)

Cibário -fêmea



*Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)

Espermateca



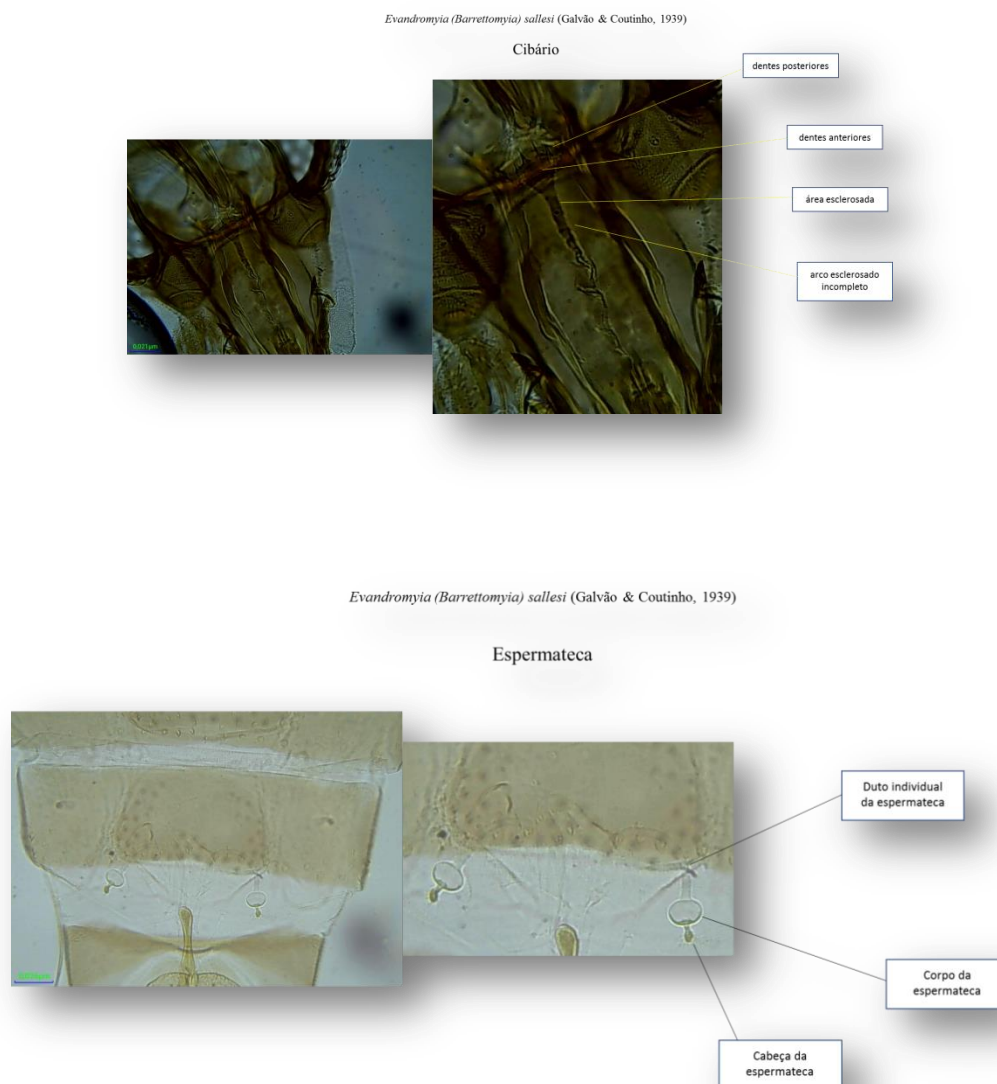


Fig. 78 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas no Município de Volta Redonda, Brasil, nos três anos de capturas; 2016, 2017 e 2018. *Lu.* - *Lutzomyia*; *Ev.* – *Evandromyia*; *Ny.* – *Nyssomyia*. Fotografias dos cibários e espermatecas das referidas espécies (Fotografias de M. Vilela, 2017)

### 3.13.1 Abundância relativa das espécies flebotomínicas, capturadas em Volta Redonda, Brasil, por ano de captura, 2016, 2017 e 2018

Em relação à abundância relativa, em cada ano de capturas, verificou-se o seguinte: em 2016, a espécie mais abundante foi *Ev. sallesi* 53,33% (8/15), seguida de *Lu. longipalpis* 40% (6/15) e por último *Ny. whitmani* 6,67% (1/15). Em 2017, a espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* 91,78%, (67/73) e as menos abundantes foram *Ny.*

*whitmani* e *Ev. sallesi* 4,11% (3/73). Também em 2018, a espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* 89,61% (69/77) (Fig. 79).

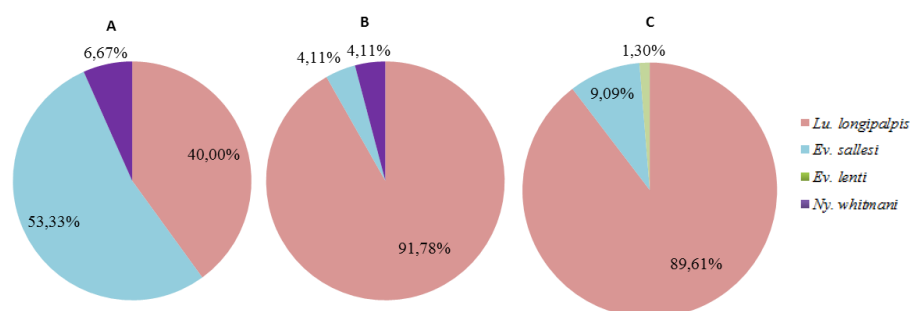


Fig. 79 - Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas no Município de Volta Redonda, Brasil, em 2016 - **A**, em 2017- **B** e em 2018 - **C**

### 3.14 Localidades, bairros, tipos e variedades de biótopos prospectados em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018

No total dos três anos de capturas, no Município de Volta Redonda, foram prospectados 52 biótopos e realizadas capturas em 15 localidades, pertencentes a 21 bairros (Fig. 80). 10 localidades (66,67%) foram positivas para a presença de flebotomíneos, sendo que destas, a espécie *Lutzomyia longipalpis* foi capturada em 9 (Fig. 80; Quadro 17).

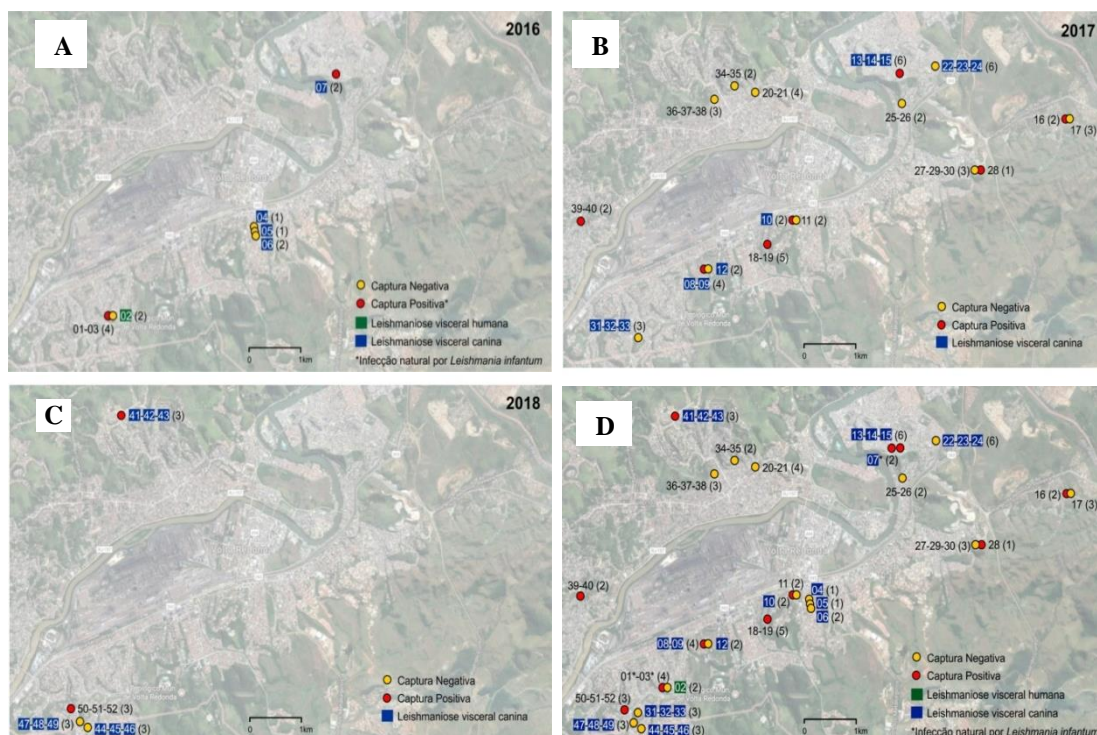


Fig. 80 - Localidades prospectadas no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em **2016 (A)**, **2017 (B)**, **2018 (C)**, e no conjunto dos **três anos (D)**. Em quadrados verdes e azuis estão assinaladas as localidades onde se registaram casos de leishmaniose visceral humana e canina respetivamente. Os números entre parêntesis () correspondem ao número de CDC colocadas. Os círculos vermelhos e amarelos, correspondem, respetivamente, a capturas positivas e negativas para flebotomíneos

As armadilhas CDC foram colocadas no exterior de habitações humanas, de construção de alvenaria (casa com paredes e alicerces feitos de tijolos, pedras ou ainda blocos de cimento). As localidades, os bairros e as respetivas coordenadas, onde foram capturadas as espécies flebotomínicas naturalmente infetadas por *L. infantum*, estão representadas no Quadro 17.

Quadro 17 - Localidades, bairros prospectados e coordenadas, em Volta Redonda, Brasil, e espécies flebotômicas capturadas em 2016, 2017 e 2018. Assinaladas, a vermelho e com um círculo azul, estão representadas as localidades e as espécies flebotômicas infectadas por *Leishmania infantum*

Localidade	Bairro	Latitude	Longitude	Alt. (m)	Espécies flebotômicas			
					<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Ny. whitmani</i>	<i>Ev. lenti</i>	<i>Ev. sallesi</i>
<b>Eucaliptal</b>	<b>Dom Bosco</b>	22°55'91''	44°11'88''	433	+	-	-	+
S. João	Aralilaia	22° 55 '91''	44°11'88''	432	-	-	-	-
	Machado Assis	22° 52 '91''	44°11'88''	433	-	-	-	-
<b>Padre Jósimo</b>	<b>Bela Vista</b>	22° 72 '75''	44°14'31''	-	-	+	-	+
	Gumercindo Rozendo	22° 51 '48''	44°14'17''	-	+	+	-	+
Rústico	Rua 80	44°11' 8''	44°14'17''	412	+	+	-	-
Laranjal	Rua 157	22° 51 '58''	44° 09' 49''	423	-	-	-	-
	Rua 156	22° 51 '89''	44° 09' 99''	423	+	+	-	+
Santo Agostinho	Esperança	22° 49 '20''	44° 07' 65''	431	+	-	-	-
	Alvorada	22° 49 '32''	44° 06' 94''	-	-	-	-	-
Três Poços	Érica Bebet	22° 50 '02''	44° 03' 72''	388	-	-	-	-
Vila Mury	Bragança	22° 49 '67''	44° 10' 19''	390	-	-	-	-
Vila Americana	Venezuela	22° 49 '76''	44° 07' 47''	-	-	-	-	-
Nova Esperança	Primavera	22° 48 '75''	44° 11' 98''	-	+	-	+	+
Minerelândi	Pequebi	22° 53 '47''	44° 12' 37''	-	-	-	-	-
	Poços Calda	22° 53 '44''	44° 12' 55''	-	+	-	-	-
São Carlos	Encosta	22° 53 '19''	44° 12' 56''	-	+	-	-	+
Água Limpa	Rua 4	22° 50 '62''	44° 06' 07''	-	+	-	-	-
Ponte Alta	Vereador	22° 53 '16''	44° 12' 84''	-	-	-	-	-
Retiro	Timor	22° 49 '68''	44° 11' 09''	-	-	-	-	-
	Arnoldo	22° 49 '95''	44° 11' 50''	-	-	-	-	-

### 3.15 Fêmeas flebotômicas capturadas, por armadilha CDC, grávidas ou ingurgitadas, em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018

Do total das 24 fêmeas capturadas, nenhuma se encontrava grávida. Quatro exemplares (16,67%) apresentaram apenas vestígios de sangue no abdômen, não tendo sido consideradas como estando com o abdômen com sangue, “vivo” ou escuro, ou seja, total ou parcialmente ingurgitadas. Destas quatro fêmeas, três são da espécie *Ev. sallesi* e uma da espécie *Lu. longipalpis*. Todos estes exemplares foram capturados em

biótopos de diferentes variedades e em três localidades distintas. A fêmea *Lu. longipalpis* foi capturada no mês de março em 2017, na localidade de Santo Agostinho. As outras três fêmeas da espécie *Ev. sallesi* foram capturadas em 2018, duas em janeiro, na localidade Nova Esperança, e uma em abril, na localidade de São Carlos. Em nenhuma das fêmeas foram observadas anomalias nas espermatecas.

### **3.16 Razão dos sexos, por espécie flebotomínica, dos exemplares capturados em Volta Redonda, Brasil, 2016, 2017 e 2018**

A razão dos sexos, para o total das espécies capturadas, foi de 5,86:1, correspondente a 5,86 machos para cada fêmea (141/24). Para as espécies capturadas, verificou-se predominância dos machos sobre as fêmeas, exceto para a espécie *Evandromyia sallesi*, na qual a razão foi de 0,29:1 (4/14). Para as restantes espécies, *Lu. longipalpis* apresentou uma razão de 14,78:1 (133/9), *Ny. whitmani* 3:1 (3/1) e *Ev. lenti* 0 (1/0).

### **3.17 Infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não *Leishmania* sp.**

Durante a identificação morfológica das espécies flebotomínicas capturadas em Volta Redonda, Brasil, não foram observados exemplares infestados por ecto ou endoparasitas.

### **3.18 Densidade flebotomínica das espécies capturadas nos meses comuns, dos anos 2016, 2017 e 2018, Volta Redonda, Brasil**

A densidade flebotomínica, por espécie e por meses de captura, comuns nos três anos de prospeção, está representada na figura 81 e no Quadro 18.

Para os meses de prospeções comuns, dos anos de 2016 e 2017, nomeadamente outubro, novembro e dezembro, verificou-se que a densidade total mais elevada ocorreu no mês de outubro (1,3), seguida do mês de dezembro (1,25). No mês de novembro, a densidade foi nula em ambos os anos pelo que se poderá verificar um ciclo bifásico. Neste mês, observou-se uma ligeira diminuição da temperatura média e um aumento da humidade relativa média quando comparada com os outros meses.

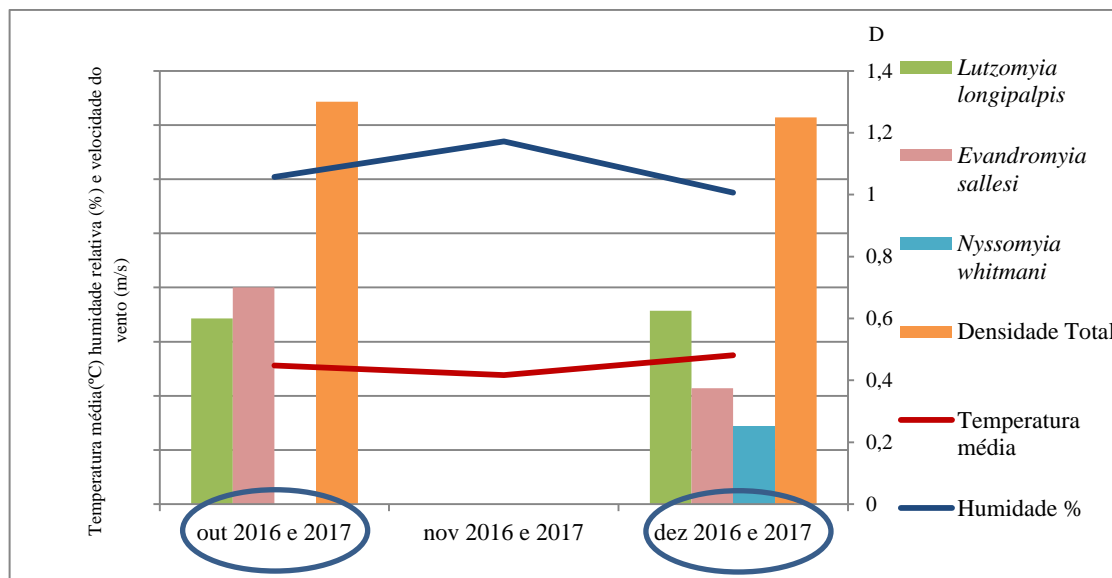


Fig. 81 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2016 e 2017, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e umidade relativa média (D - Densidade)

Quadro 18 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2016 e 2017, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e umidade relativa média

Espécie flebotomínica	D; out 2016 e 2017	D; nov 2016 e 2017	D; dez 2016 e 2017
<i>Lu. longipalpis</i>	0,6	0	0,625
<i>Ev. sallesi</i>	0,7	0	0,375
<i>Ny. whitmani</i>	0	0	0,25
Densidade Total	1,3	0	1,25
Temperatura média	25,6	23,8	27,5
Umidade %	60,44	67	57,5

D = Densidade (nº de flebótomos / armadilha CDC, noite)

Nos meses em comum, dos anos de 2017 e 2018, a densidade total, e por espécie, está apresentada na figura 82 e Quadro 19. Em abril, a densidade total foi mais elevada e *Lu. longipalpis* a espécie com maior densidade.

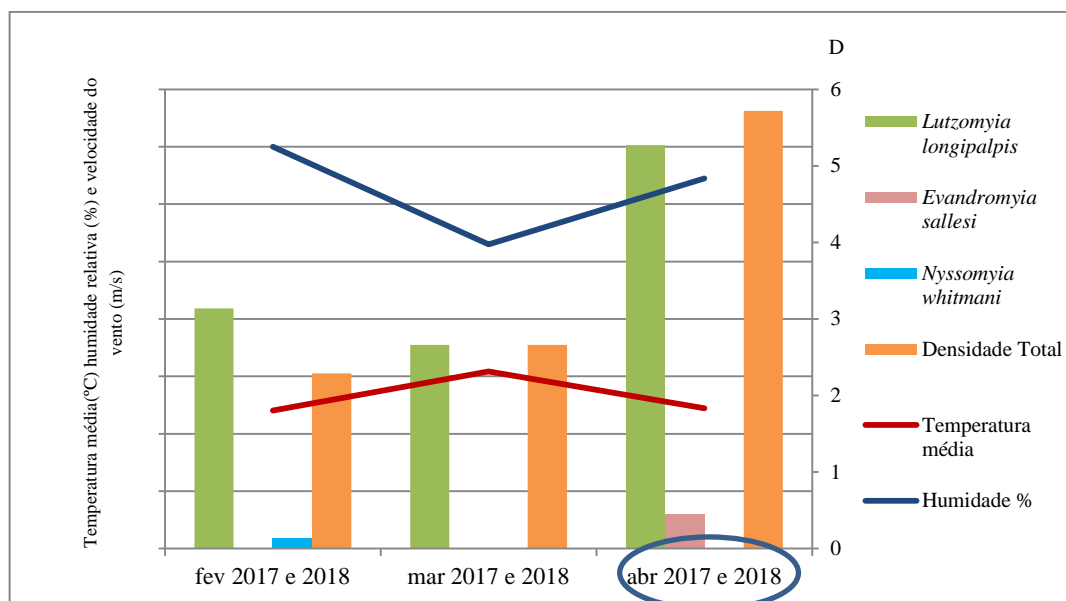


Fig. 82 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2017 e 2018, no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e umidade relativa média (D - Densidade)

Quadro 19 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, durante os meses de captura comuns nos anos de 2017 e 2018 no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e umidade relativa média

Espécie flebotomínica	D; fev. 2017 e 2018	D; mar. 2017 e 2018	D; abr. 2017 e 2018
<i>Lu. longipalpis</i>	3,14	2,66	5,27
<i>Ev.sallei</i>	0	0	0,45
<i>Ny.whitmani</i>	0,14	0	0
<b>Densidade Total</b>	2,29	2,66	5,72
<b>Temperatura média</b>	24,05	30,85	24,45
<b>Umidade %</b>	70	53	64,5

**D** = Densidade (nº de flebótomos / armadilha CDC, noite)

Em relação aos três anos de captura e respectivos meses, a densidade flebotomínica, por espécie e total, está representada na figura 83.

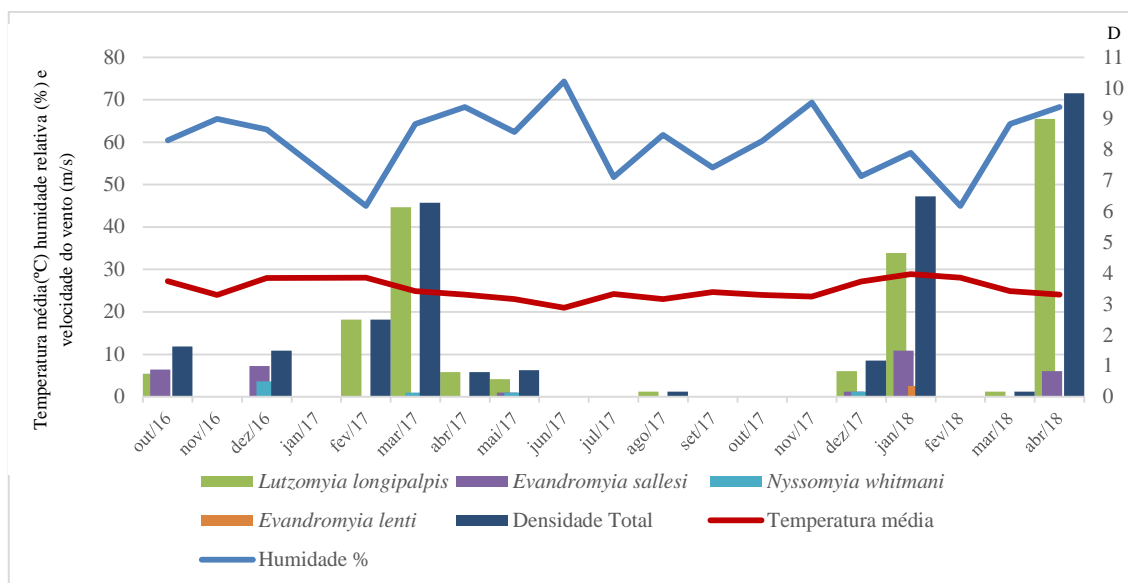


Fig. 83 - Densidade flebotomínica, por espécie e total, dos anos 2016, 2017 e 2018, e respectivos meses de captura no Município de Volta Redonda, Brasil. Temperatura média e umidade relativa média ( D - Densidade)

Tal como se verifica na figura 83, *Lu. longipalpis* apresenta maiores densidades nos meses de fevereiro e março de 2017, e janeiro e abril de 2018. Como referido anteriormente, a densidade total desta espécie foi superior em abril de 2018, inclusivamente quando comparada com a de abril de 2017.

### 3.19 Infecção flebotomínica por *Leishmania infantum*, em exemplares capturados no Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2016, 2017 e 2018

Tal como para os flebotomíneos fêmeas capturadas no Alentejo, Portugal, as fêmeas capturadas em outubro e dezembro de 2016, fevereiro, março e abril de 2017, e ainda em 2018 (janeiro a abril), foram submetidas a análise molecular para identificação de uma eventual infecção por *Leishmania* sp., através de técnicas de PCR multiplex.

Em relação às fêmeas capturadas, três encontravam-se naturalmente infetadas por *Leishmania infantum*, nomeadamente uma fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*, capturada na localidade de Eucaliptal, no mês de outubro de 2016. Também duas fêmeas da espécie *Evandromyia sallesi* foram encontradas infetadas, uma delas, também capturada na localidade Eucaliptal, durante o mês de outubro de 2016 e outra na localidade de Padre Jósimo, em dezembro de 2016 (Fig. 84 e 85). As fêmeas

capturadas em 2017 e 2018, não foram detetadas como positivas para a presença do DNA de *Leishmania*.



Fig. 84 - Biótopos peridomésticos prospectados no Município de Volta Redonda, Brasil, na localidade de Eucaliptal, onde foi capturada uma fêmea de *Lu. longipalpis* naturalmente infetada por *L. infantum*. **A** - armazém, **B** - galinheiro (Fotografia M. Vilela, 2016)

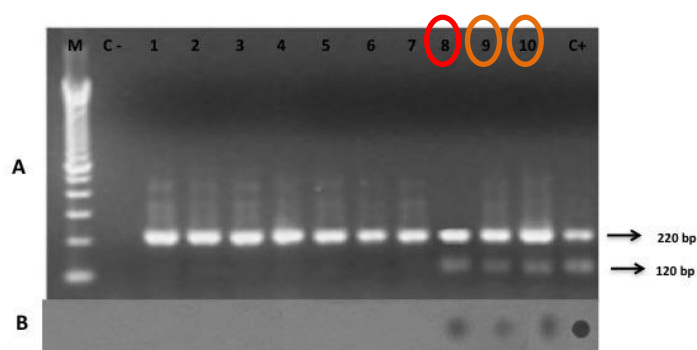


Fig. 85 - Fêmeas flebotomínicas positivas, para *Leishmania* sp., por Dot Blot, PCR multiplex, através da amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* sp. (120 pb) e gene cacophony de flebotomíneos (220 pb). **A**: gel de agarose 2%, onde a coluna 8 corresponde à espécie *Lu. longipalpis* e as colunas 9 e 10 à espécie *Evandromyia sallesi*. M- Peso Molecular de 100 pb; C- Controle negativo (sem DNA adicionado); colunas 1 e 2: Controle negativo - flebotomíneos machos) e **B**: Hibridização por Dot blot com sonda biotilada específica para *L. infantum*. **8 a 10**: 1 Amostra de *Lu. longipalpis* (slot 8) e 2 amostras *Evandromyia sallesi* (slots 9 e 10) positivas para infecção por *L. infantum*. C+: controle positivo.

## 4 Discussão e Conclusões

Com o trabalho realizado, identificou-se a fauna flebotomínica e determinaram-se os aspetos bioecológicos e vetoriais, de duas regiões endémicas de Leishmaniose humana e canina: uma, no Velho Mundo, em que a fauna flebotomínica não era estudada há mais de uma década (Alves-Pires *et al.*, 2004), e assim, retomaram-se os estudos flebotomínicos e a monitorização na região do Alentejo, Portugal, e outra no Novo Mundo, nomeadamente na Mesoregião Sul Fluminense, Município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em que os casos autóctones de Leishmaniose humana e canina, somente foram reportados, pela primeira vez, em 2014, com registo de óbitos, mas onde nunca tinham sido realizados estudos flebotomínicos, de forma sistematizada, desconhecendo-se, então, não só as espécies existentes na região, como as que, eventualmente, pudessem ser vetoras (Sangenis *et al.*, 2014).

Ainda que nas duas grandes regiões estudadas, e em continentes distantes, os vetores sejam diferentes, há a considerar os outros aspetos comuns deste sistema biológico/bioecológico, que fazem parte da mesma zoonose negligenciada, nomeadamente o agente patogénico (*Leishmania infantum*), o principal reservatório (cão), os hospedeiros vertebrados acidentais (seres humanos) e os biótopos preferenciais. Contudo, o foco, ou seja, a charneira deste trabalho, é o que está menos, ou não esclarecido, nomeadamente a presença de espécies flebotomínicas suspeitas, potenciais, ou vetoras, quer numa região, quer noutra. É de referir, por exemplo, que até à realização deste trabalho (2016-2017), nenhum exemplar, de qualquer espécie flebotomínica do Alentejo, tenha sido capturado infetado com *Leishmania*.

A referida abordagem é o grande desafio, ou seja, tentar atualizar e determinar parâmetros vetoriais, num estudo por conveniência, que possam conduzir ao esclarecimento vetorial do sistema bioecológico em duas regiões de “dois Mundos”, ligados pelo Atlântico que permitiu, não a existência das mesmas espécies flebotomínicas mas que espécies vetoras diferentes pudessem transmitir a mesma doença (Leishmaniose), quer aos seres humanos, quer a animais (cães), e que, estes sim, deslocaram-se para regiões em que insetos, de géneros e espécies diferentes, mas pertencentes à mesma subfamília, causaram e causam esta zoonose que, quando não tratada, pode conduzir à morte e que apresenta graves repercussões na saúde pública e animal. Assim, tal como referem Lana *et al.* (2018), é necessário conhecer, no que diz

respeito aos vetores, o perfil epidemiológico local, para se poder contribuir para a diminuição do risco de transmissão da(s) doença(s).

No Alentejo, Distritos de Évora e Beja, Portugal, durante o período de prospeção flebotomínica, em dois anos consecutivos, 2016-2017, foram assinaladas as cinco espécies conhecidas no país. É de salientar que *Phlebotomus papatasi*, de ambos os sexos, que em estudos anteriores nunca tinha sido capturado no Distrito de Évora (Semião Santos *et al.*, 1995; Alves-Pires *et al.*, 2004) foi capturado neste Distrito, em 2017, no concelho de Alandroal, na freguesia de Terena, na localidade de S. Pedro, e que nesta mesma localidade foram capturadas, por ordem decrescente de abundância relativa, cinco espécies, nomeadamente *P. perniciosus*, *Sergentomyia minuta*, *P. sergenti*, *P. ariasi* e *P. papatasi*. Este facto, ou seja, na mesma localidade serem assinaladas as cinco espécies mencionadas, foi único, uma vez que nas nove localidades, pertencentes a nove freguesias e a seis concelhos prospetados, do Distrito de Évora, esta ocorrência não se tornou a verificar. *P. papatasi* tem preferência por climas quentes e áridos e, no mês de julho, mês em que os flebotomíneos desta espécie foram capturados, foi o mês em que se verificou uma temperatura média mais elevada (27,7°C) e uma humidade relativa mais baixa (40,05%). Estes fatores podem ter influenciado a captura destes insetos, ainda que a densidade não tenha sido elevada (D=0,19).

O tipo e variedade de biótopos, onde a referida espécie foi capturada (muro de pedras e abrigo animal - curral de veados), não parece ter sido um fator determinante da ocorrência, uma vez que outras espécies, e em maior densidade, foram capturadas nesses biótopos tais como *P. perniciosus*, *P. ariasi* e *S. minuta*. No entanto, comum às duas variedades de biótopos referidos, para além de *P. papatasi*, foi a presença da espécie *P. perniciosus* que apresenta uma maior plasticidade em termos bioclimáticos. Também, num estudo realizado em 2012-2013, na região da Extremadura, Sudoeste de Espanha, e limítrofe ao concelho de Alandroal, as mesmas cinco espécies foram assinaladas e *P. papatasi*, *P. ariasi* e *P. sergenti*, assinaladas, pela primeira vez, na região de Badajoz (Bravo-Barriga *et al.*, 2016). Contudo, tal como referem estes Investigadores, não é de estranhar que a densidade tenha sido baixa, uma vez que é ainda uma espécie considerada rara na Península Ibérica. No entanto, alterações climáticas e ambientais que possam vir a ocorrer, no sentido de uma aridização, poderão

contribuir para o aumento da densidade e dispersão desta espécie, que é um importante vetor de *L. major* em vários países de Bacia mediterrânica, Sudão, médio oriente e Paquistão (Maroli *et al.*, 2013).

Tal como foi observado em estudos anteriores, mas noutras regiões de Portugal, nomeadamente nos Distritos de Coimbra (Pereira *et al.*, 2010), Castelo Branco (Vilela *et al.*, 2016), Santarém (Branco *et al.*, 2013), Lisboa (Gouveia, 2016), Setúbal (Afonso *et al.*, 2005) e Faro (Alves-Pires *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2009, 2013), e utilizando-se o mesmo método de captura (armadilha luminosa CDC), *P. perniciosus* foi a espécie que apresentou maior abundância relativa (47,80% - 206/431) e maior densidade [mês de julho (D=2,73)], nos dois anos de capturas, nos dois Distritos do Alentejo. Pela primeira vez, no Alentejo, no Distrito de Beja, concelho de Serpa, freguesia de Salvador, localidade Monte da Morena, foi capturada uma fêmea de *P. perniciosus*, infetada por *L. infantum*, detetada por técnicas moleculares. No entanto, e há mais de uma década, fêmeas desta espécie foram dissecadas e observadas ao microscópio ótico, para eventual observação e posterior cultura de *Leishmania* e nenhuma, à data, se encontrava infetada (Semião-Santos *et al.*, 1995; Alves-Pires, 2000; Alves-Pires *et al.*, 2004).

Tendo em conta que *P. perniciosus* é uma espécie comprovadamente vetora da referida leishmania, em Portugal (Alves-Pires, 2000; Alves-Pires *et al.*, 2001; Campino *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2009), e que apresentou, neste trabalho, durante dois anos consecutivos, a maior distribuição, a maior densidade e, ainda, ter sido capturada infetada por *L. infantum*, num biótopo doméstico, variedade armazém, e uma fêmea ter sido capturada alimentada em ser humano, é bem provável que seja a espécie vetora, no Alentejo, quer no Distrito de Évora, quer no Distrito de Beja, sendo capaz de transmitir Leishmaniose humana e canina. Contudo, seria importante que outros estudos fossem continuados, nesta região, para confirmação que esta espécie é a que mantém o ciclo desta zoonose, sendo, portanto, o único, ou o principal, vetor de *L. infantum*. Com este novo achado, nesta região, poder-se-á ter contribuído para o esclarecimento da transmissão vetorial da Leishmaniose (humana e canina) no Alentejo e, assim, colmatar a lacuna que até à presente data se verificava. É de referir que Cortes *et al.* (2012a) demonstraram, num estudo realizado em 2009, que o Distrito de Beja era um novo foco de leishmaniose canina, dada a seroprevalência observada em 80 cães (12,12%), diagnosticados em clínicas veterinárias. No mesmo estudo, é referido que a ausência de

estudos entomológicos, em Beja, não permitia correlacionar a elevada seroprevalência canina com a atividade flebotomínica, o que, presentemente, já se tornou possível. Também os Investigadores acima mencionados, chamam a atenção que, entre 2004 e 2008, em 79 casos de Leishmaniose visceral humana, reportados pela Direção Geral de Saúde, sete casos foram registados em Beja. Segundo Risueño *et al.* (2018), em áreas endémicas de Leishmaniose, quer na Península Ibérica, em particular, quer na Bacia mediterrânica, em geral, a monitorização de espécies flebotomínicas, e especialmente *P. perniciosus*, é um útil indicador do risco de infeção, quer do reservatório habitual (cão), quer de animais silváticos que cada vez mais se aproximam e adaptam a ambiente antrópicos, devido à procura de alimentos e alteração dos seus habitats naturais, nomeadamente raposas, coelhos, ginetas, fuinhas e gatos silváticos que foram já capturados infetados no Sudeste de Espanha. Assim, em áreas particularmente rurais, há que ter em conta os ciclos domésticos habituais e os silváticos que, pelas razões mencionadas, cada vez mais, se podem interligar. Nos Distritos de Évora e Beja, para além de uma fêmea estar alimentada em ser humano, outras três fêmeas, desta mesma espécie, estavam alimentadas em *Bambusicola thoracicus* (1) e *Marmosa murina* (2). Este último animal não está descrito na Europa e, associado à homologia obtida não ter sido muito elevada, poder-se-á sugerir que estes flebotomíneos se alimentaram em outra fonte animal muito próxima a marsupiais, e que as suas sequências não foram ainda depositadas no *Gene Bank*. Este tipo de situação pode ocorrer quando se realiza pesquisa de fontes alimentares de insetos hematófagos. Sendo o *cyt b* um dos alvos que mais possuem sequências de diferentes prováveis fontes alimentares, o *Gene Bank* ainda não cobre a totalidade da fauna presente. Assim, assume-se, neste estudo, que estas duas fêmeas de *P. perniciosus* se alimentaram em “roedores”. A alimentação nestes “marsupiais” deverá ser confirmada com estudos posteriores de modo a determinar se estes pequenos roedores têm influência, ou não, na manutenção de um ciclo silvático. Há que referir, e apresentando também uma grande importância, que no Concelho de Torres Novas, num estudo flebotomínico realizado em 2010, capturaram-se 4 fêmeas de *P. perniciosus* alimentadas, igualmente, em *Marmosa murina* Branco (2011). Sabe-se, desde há vários anos, que este vetor apresenta uma grande plasticidade trófica, o que, na falta de hospedeiros vertebrados considerados preferenciais, mantém as fêmeas alimentadas e por consequência, uma população ativa e densidades elevadas

em relação a outras espécies que não apresentam este comportamento trófico. Ora, uma espécie naturalmente suscetível ao parasita *L. infantum*, que apresenta uma elevada plasticidade trófica e um perfil bioclimático que vai desde áreas húmidas a periáridas, é sem dúvida um excelente vetor e, provavelmente, de acordo com os estudos de Baptista *et al.*, (2007), será, num futuro relativamente próximo, o principal vetor de Leishmaniose humana e canina, para não dizer o único, a nível do país, no que diz respeito a esta zoonose.

A espécie *P. sergenti*, em 2016, apresentou uma abundância relativa de 33,56% (50/149), semelhante à espécie *P. perniciosus* (51/149), o que está de acordo com estudos anteriores (Semião-Santos *et al.*, 1995; Afonso, *et al.*, 2005). No entanto, no ano seguinte (2017), a abundância relativa de *P. sergenti* foi de 1,77% (5/282), chegando mesmo a ter um valor inferior à espécie *P. ariasi* 3,19 % (9/282), que é uma espécie com preferência por climas quentes, mas mais húmidos, como o que se verifica na região do Alto Douro (Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Afonso *et al.*, 2007). É de referir que em 1994, 1999-2000 e 2007, durante prospeções realizadas em diferentes zonas do Alentejo, *P. sergenti* foi a espécie mais abundante (Semião Santos *et al.*, 1995; Alves Pires *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2010a). No entanto, também no sul de Espanha, verificou-se que *P. sergenti* coloniza não só zonas áridas, mas também zonas mais húmidas (Martinez-Hortega, 1988), o que está de acordo com os resultados obtidos, pela primeira vez, na Arrábida, Portugal, em 2002-2003 (Afonso *et al.*, 2005). É de salientar que só se teve a oportunidade de verificar a ocorrência acima referida, ou seja, a diferença entre as abundâncias relativas nos dois anos de prospeção, por se terem efetuado prospeções em dois anos consecutivos (2016-2017). A abundância e densidade de *P. sergenti*, em 2016, quase tão elevada quanto *P. perniciosus*,  $p \leq 0,05$  (0,001), mostra que aquela espécie poderá ser um fator facilitador para a instalação de casos autóctones de Leishmaniose cutânea antroponótica, por *L. tropica*, devido à vinda de pessoas infetadas, quer se tratem de turistas, militares e particularmente de migrantes oriundos do norte de África e Médio Oriente. Lamentavelmente, situações de conflitos bélicos prolongados, como as que se verificam presentemente, fazem com que haja deslocamentos em massa, de pessoas em condições precárias. Por exemplo, segundo Barón *et al.* (2013), 51.235 migrantes do norte de África e médio oriente entraram em Espanha, sem contar com os migrantes ilegais. Se eventualmente, algumas destas

pessoas estiverem infetadas, e tendo em conta que, na maior parte das vezes, ficam instaladas em parcas condições, nos países de acolhimento, e que estas facilitam o contacto com os vetores, poder-se-á instalar um ou mais focos na Península Ibérica. Ao se considerar as alterações climáticas e ambientais como fatores agravantes, não só da dispersão como da densidade, a elaboração de mapas de risco para esta e para as outras espécies vectoras, ou potenciais vectoras, torna-se extremamente necessária (Chalghaf *et al.*, 2018). Em estudos realizados recentemente, em 2015, no Distrito de Setúbal, Palmela, (Miguel, 2016), e em Lisboa (Freguesia de Alcântara) (Gouveia, 2016), *P. sergenti* foi capturado em biótopos domésticos, o que pode corroborar a hipótese acima preconizada.

No que diz respeito à espécie *P. ariasi*, esta foi capturada nos dois anos de prospeção, ou seja, em 2016 e 2017, quer no Distrito de Évora, quer no Distrito de Beja, facto extremamente importante uma vez que é, tal como *P. perniciosus*, uma espécie comprovadamente vectora de *L. infantum* em Portugal, mesmo quando as densidades são inferiores à espécie *P. perniciosus*, como se verificou num estudo realizado em Torres Novas, em 2010 (Branco *et al.*, 2013). Contudo, devido ao seu perfil bioclimático é provável que a densidade de *P. ariasi* diminua ainda mais no sul de Portugal, devido ao aumento da temperatura média anual, tornando *P. perniciosus* o vetor de excelência. Segundo um estudo realizado por Baptista *et al.*, (2007), em que se utilizaram modelos matemáticos, esta tendência foi manifestamente observada.

Em relação à espécie *S. minuta*, uma vez que o método de captura utilizado foi exclusivamente armadilha luminosa CDC, o valor da abundância relativa foi, de certa forma, inesperado ao ser semelhante ao da espécie mais abundante, *P. perniciosus*, uma vez que *S. minuta* apresenta baixa atratividade pela luz. Na maioria dos estudos, esta espécie tem tendência a ser mais abundante quando se utilizam, como método de captura, papéis impregnados com óleo de rícino ou de castor (Rioux *et al.*, 2013; Prudhomme *et al.*, 2015; Alten *et al.*, 2016). No entanto, em Palmela, e num estudo recentemente efetuado numa área rural, em 2015, por Miguel (2016), em que só se utilizaram armadilhas luminosas CDC, *S. minuta* apresentou maior abundância e densidade, em relação às outras três espécies capturadas. Assim, parece haver uma tendência atual de *S. minuta* ser capturada por ambos os tipos de armadilha, independentemente dos tipos e variedades de biótopos. No entanto, no presente estudo,

a análise estatística, dirigida a esta espécie, por amostras emparelhadas, parece indicar que a mesma apresenta densidades diferentes para as diferentes variedades de biótopos, ainda que não se tenha conseguido determinar exatamente quais. Seria muito importante fazer estudos direcionados para esta espécie, outrora considerada exclusivamente como herpetofílica e vetora de *Sauroleishmania*, uma vez que os perfis bioecológicos e vektoriais parecem estar a modificar-se. Em Portugal, em Albufeira, Algarve, e pela primeira vez na Europa, foi detetada, por análise molecular, um exemplar de *S. minuta* infetada por *L. major* (Campino *et al.*, 2013). Surpreendentemente, no Alentejo, e através do trabalho realizado, também pela primeira vez na Europa, *S. minuta* foi detetada naturalmente infetada por *L. infantum*, inclusivamente nos dois anos de captura (2016 e 2017) (Pereira *et al.*, 2017). Este resultado, ainda que não haja evidência científica do papel de *S. minuta* como espécie vetora de *L. infantum*, vem suportar a hipótese apresentada por Maia & Depaquit (2016) que defendem o importante papel desta espécie na eventual transmissão da parasitose a mamíferos hospedeiros, nomeadamente, entre a população canina, ainda que refiram que mais estudos devam ser realizados no que diz respeito a este “paradigma”. Em Itália, na Província de Bari, Latrofaa *et al.*, (2018), verificaram, por técnicas moleculares, 9 exemplares de *S. minuta* naturalmente infetados pela referida espécie

de *Leishmania*. Contudo, também estes Investigadores não confirmam, em absoluto, que *S. minuta* seja uma espécie vetora, chamando a atenção para o que se referiu anteriormente. O que presentemente é igualmente importante, é ter-se verificado que no Distrito de Beja (2017), uma *S. minuta* alimentou-se em ser humano, o que está de acordo com um estudo realizado no Algarve, no qual, se chama atenção para o comportamento antropofílico oportunista desta espécie flebotomínica (Maia *et al.*, 2015). Em Espanha, na região da Extremadura, num estudo realizado em 2012-2013, capturou-se uma *S. minuta* alimentada em ser humano (Bravo-Barriga *et al.*, 2016). Assim, tendo em conta as espécies vectoras de *L. infantum*, é provável que, num futuro próximo, na Europa, outro género que não apenas *Phlebotomus*, possa ter importância na epidemiologia desta zoonose.

Em Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, que é um novo foco de Leishmaniose, humana e canina, desde 2014, como já mencionado anteriormente, realizou-se um estudo flebotomínico, durante 18 meses, de outubro de 2016 a abril de

2018 e, tal como no Alentejo, Portugal, procurou-se identificar e determinar não só as espécies flebotomínicas existentes, ou seja, determinar a fauna flebotomínica da região, como assinalar a ou as espécies vetoras de *L. infantum*. Desta forma, poder-se-ia contribuir para o conhecimento da ecoepidemiologia da Leishmaniose na Mesoregião Sul Fluminense. Durante o período referido, prospectaram-se 15 localidades, das quais 66,67% foram positivas para a presença de flebotomíneos.

O Brasil é o país que apresenta a mais elevada incidência de Leishmaniose visceral humana americana e esta, a par da Leishmaniose cutânea americana, está cada vez mais em franca dispersão, o que revela uma alteração dos perfis epidemiológicos, quer em áreas rurais, quer em áreas urbanas, como é o caso de Campo Grande, Estado de Belo Horizonte, e o Estado de Rio de Janeiro (Carvalho *et al.*, 2014). As alterações do modelo de transmissão vetorial de Leishmaniose no Rio de Janeiro podem ser atribuídas a vários fatores desde as insuficientes medidas adotadas para o controlo, tendo em vista os custos financeiros, à adaptação do principal vetor, que é a espécie *Lu. longipalpis*, a ambientes modificados pelo ser humano, e além de ser antropofílica, apresenta uma elevada plasticidade trófica que lhe permite ter elevadas densidades na ausência de hospedeiros preferenciais (Silva *et al.*, 2015)

A presença de *Lu. longipalpis* em ambientes urbanos provem de um processo de dispersão contínua, pelos motivos acima mencionados. Em meios periurbanos, a existência de galinheiros pode favorecer o aparecimento e a colonização da área pela referida espécie. No entanto, há que referir que além de *Lu. longipalpis* outras espécies flebotomínicas podem estar infetadas com *L. infantum* como é o caso de *Nyssomyia whitmani* (Ferreira *et al.*, 2018).

Através dos estudos flebotomínicos realizados em Volta Redonda, e agora de forma sistematizada, assinalaram-se pela primeira vez, quatro espécies: *Lu. longipalpis*, *Evandromyia sallesi*, *Ny. whitmani* e, no último ano de capturas (2018), *Ev. lenti*. Destas espécies capturadas, *Lu. longipalpis* e *Ev. sallesi*, por técnicas moleculares, foram detetadas infetadas por *L. infantum*. Ainda que *Lu. longipalpis* deva ser o grande vetor na região estudada, uma vez que é o principal vetor do Novo Mundo, não se pode descurar a importância das outras espécies.

Ao realizar-se estes estudos flebotomínicos no Velho e no Novo Mundo, em duas áreas, uma não estudada há mais de dez anos e outra ainda não monitorizada,

através dos resultados obtidos, acreditamos ter contribuído, em parte, para o esclarecimento ecoepidemiológico da(s) Leishmaniose(s) zoonótica (s) nas referidas regiões. *Contudo, este é apenas o início...*

## 5. Referências bibliográficas

Abranches, P., & Pires, C.A., 1980. O kala-azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 3: 203-217.

Abranches, P., Conceição-Silva, F.A. & Silva-Pereira, M.C.D., 1984. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *J Trop Med Hyg.*, 87: 197-200.

Afonso, M.M., 2013. “Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana”. *Tese de Doutorado*, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil 172pp.

Afonso, M.O., 2015. Família PSYCHODIDAE (flebotomos). Sistemática, morfologia, distribuição, bioecologia e importância em Medicina. Identificação morfológica de espécies flebotomínicas. *Aula Teórico-prática, XIII Mestrado de Parasitologia Médica*, (Moodle), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 119pp.

Afonso, M.O. & Alves-Pires, C. 2008. Capítulo Bioecologia dos vectores. In *Leishmaniose canina*, Santos-Gomes, G. & Fonseca, I.M. (Eds.), Lisboa, Chaves Ferreira - Publicações S.A: 27-40.

Afonso, M.O., Brazil, R.P. & Alves-Pires, C., 2007a. Carlos França in the Science (1877-1926). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1-2): 23-26.

Afonso, M.O., Campino, L., Cortes, S. & Alves-Pires, C., 2005. The phlebotomine sand flies of Portugal. XIII - Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12: 69-72.

Afonso M.O., Cardoso, L., Anastácio, S. & Janz, J.G., 2007b. The phlebotomine sand flies of Portugal - XI. Ecology of the leishmaniasis vectors in Alijó municipality, Alto Douro region 2001. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14: 19-22.

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J. *et. al.*, 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, (3):1-40.

Albuquerque, A., 2013. Comportamento biológico “in vitro” de “novas espécies” de *Leishmania* no Velho Mundo. *Tese de Mestrado*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 126pp.

Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., *et. al.*, 2016. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, (2): 1-22.

Alvar., J., Jiménez, C., Moreno, J., 2017. Leishmaniasis. El duro camino de una enfermedad de la pobreza. Universidad de Alcalá (Ed.), 1, 144pp.

Alves, V.B., Freitas, R.A. & Barret, T., 2008. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103, (2): 251- 253.

- Alves-Pires, C. & Ribeiro, H., 1991. The phlebotomine sandflies of Portugal V. Observations on the ecology of vectors of leishmaniasis in the Alto Douro region. *Parasitology* 33: 63-68.
- Alves-Pires, C., Afonso, M.O., Janz, J.G., Semião-Santos, S., 2004. The phlebotomine sand flies of Portugal. XII. The phlebotomine of the Évora leishmaniasis focus (1999-2000). *Acta Parasitologica Portuguesa*, 11: 41-45.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, G., Dedet, J.P., Pratlong, F., 2001. Les phlébotomes du Portugal X - Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8: 374-375.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Janz, J.G., Afonso, M.O., 2008. Os flebotomos de Portugal. XIV - Os vectores de leishmaniose no foco zoonótico do Sotavento Algarvio. *Acta Parasitológica Portuguesa* 15, (1-2): 39-52.
- Alves-Pires, C. & Capela, R.A., 1996. Phlébotomes du Portugal VIII. Première mention de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917 à l'île de Madère. *Parasite*, 3: 94.
- Alves-Pires, C., Capela, R.A., Pena, I., 1997. The phlebotomine sandflies of Portugal. IX - The occurrence of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) at the Salvage Grande Island (Madeira, Portugal). *Bol. Soc. Port. Entomol.*, 178: 389-395.
- Alves-Pires, C. Novo, M. T., Sousa, C.A., 1992. Os flebotomos de Portugal - VII Preferências hemáticas dos flebotomos (Diptera, Psychodidae) da região do Alto Douro. *Bol. Soc. Port. Entomol.*, 2: 609-615.
- Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L., Abranches, P., 1991. Phlébotomes du Portugal. IV- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 66 (1): 47-48.
- Amaro, F., Hanke, D., Zé-Zé, L., Alves, M., *et al.*, 2016 Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. *Virus Research*, 214.
- Amaro, F., Luz, T., Parreira, P., Ciufolini, M. G. *et al.*, 2011. Vírus Toscana na população portuguesa. *Acta Med. Port.*, 24: 503-508
- Andrade Filho, J. D., Galati, E, A.B., Bianchi, A.W. & Aires, F.A.L., 2004. Description of *Micropygomyia (Silvamyia) echinatopharynx* sp. nov. (Diptera: Psychodidae) a new species of phlebotomine sand fly from the State of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99, (6): 609-615.
- Antoine, J. C., 1994. Leishmanies cycle et adaptations. *Méd. Arm.*, 22, (1): 23-27.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. *et al.*, 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of Leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Eurosurveillance*, 18 (30): pii=20540 <http://www.eurosurveillance.org/ViewAarticle.aspx?Aarticleid=20540>
- Aragão, H.B., 1927. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos flebotomos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 20: 177-185.

- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 30:1269–1281.
- Azar, D. & Nel, A., 2003. Fossil psychodoid flies and their relation to parasitic diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 35-37.
- Azevedo, J. F., 1946. Novos dados sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *An. Inst.Med.Trop.*, 3: 7-20.
- Azevedo, J.F., & Teixeira, A.W.G., 1946. Sobre as preferências hemáticas das espécies portuguesas de *Phlebotomus*. *An. Inst. Med. Trop*, 3: 159-181.
- Balbino, V.Q., Marcondes, C.B., Alexander, B., Luna, L.K.S., *et al.*, 2001. First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Farhia, 1977 outside of Amazonian Region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, 96, (3): 315-317.
- Ballart, C., Barón, S., Alcover, M.M., Portús, M., & Gallego, M., 2012. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Tropica*, 122: 155-159.
- Baptista, S., Afonso, M.O., Casimiro, E., Campino, L. *et al.*, 2007. Spatial Distribution of *Leishmania* sand fly vectors in Portugal: risk areas, climate change and impact on Tourism. *International Conference on Climate Change Impacts on Tourism, Lisbon, Portugal. Abstract book*: 35.
- Barón, F., Morillas-Márquez, M., Morales-Yuste, V., Díaz-Sáez, M. *et al.*, 2013. Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. *Parasitology*, 140: 1413–1421.
- Basset, D., Faraut, F., Marty, P., Dereure, *et al.*, 2005. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes and Infection* 7: 1370-1375.
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37: 1097–110.
- Bichaud, L., Izri, A., de Lamballerie, X., Moureau, G. *et al.*, 2014. First detection of Toscana virus in Corsica, France. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, (2): 101-104.
- Bogdan, C., Schonian, G. & Banuls, A., 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical infectious diseases* 32: 302-6.
- Branco, S., 2011. Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de *Leishmania* sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal. *Tese de Mestrado*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 194 pp.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristóvão, J. M. S., Gonçalves, L., Campino, L. & Afonso, M.O., 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Tropica*, 125, 339-348.

- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M.O., *et al.*, 2016. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and risk factors associated. *Acta Tropica*, 164: 414-424.
- Bray, D. P., Bandi, K. K., Brazil, R. P., Oliveira, A. G., & Hamilton, J. G., 2009. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J. Med. Entomol.*, 46: 428-434
- Brazil, R. & Brazil, B., 2003. Bionomia. In *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel & Lainson (Ed.) Fiocruz, Rio de Janeiro, 257-274.
- Brazil, R. & Brazil, B., 2014. Vetores da leishmaniose Tegumentar Americana In *Leishmaniosis do Continente Americano*. Fátima Conceição-Silva, Carlos Roberto Alves Fiocruz (Ed.) 512 pp.
- Brazil, R.P. & Oliveira, S.M., 1999. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.*, 13, (4): 463-464.
- Burza, S., Croft, S.L. & Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis, *The Lancet*, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- Calheiros, J.M., Casimiro, E., Almeida, A.P.G., Alves-Pires, C., Collares Pereira, M., Cardoso, M.F., Santos-Silva, M., Afonso, M.O. & Sousa, R., 2006. Saúde humana e implicações para o turismo (Capítulo 6). In: F.D. Santos e P. Miranda ed. *Alterações Climáticas em Portugal. Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação - Projecto SIAM II*. Gradiva, Lisboa: 233-270.
- Calzolari, M., Chiapponi, C., Bellini, R., Bonilauri, P., *et al.*, 2018. Isolation of three novel reassorting phleboviruses, Ponticelli I, II, III, and of Toscana virus from field-collected sand flies in Italy. *Parasites & Vectors*, 11, 84.
- Câmara Municipal de Évora, 2014. *Plano Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios de Évora – 2014/2018*. Caderno 1, 54pp.
- Câmara Municipal de Serpa, 2007. *Plano Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios do concelho de Serpa*, Caderno II, 49pp.
- Campino, L., 1998. Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. *Tese de Doutoramento*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. 192 pp.
- Campino, L. & Maia, C., 2010. Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23: 859-864.
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M.O. & Maia, C., 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 516-518.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O. & Dedet, J.P., 2006. Leishmaniasis in

- Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop.Med. Int. Health*, 11: 1708-1714.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratlong, F., Dedet, J.P., *et al.*, 1994. The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, 1: 391- 392.
- Campino, L., Santos-Gomes, G. & Pratlong F., 1997. Género *Leishmania* em Portugal. Zimodemos isolados a partir do reservatório domestico e silvático, do vector e de casos humanos autóctones e importados. V Congresso Ibérico de Parasitologia, Évora. *Acta Parasitol Port.*; 4: 65.
- Can, H., Doskaia, M., Ozdemir, H.G., Sahar, E.A. *et al.*, 2016. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of Izmir, Turkey. *Experimental Parasitology*, 167: 109-114.
- Cardoso, L., 2004. Estudos de infecção canina por *Leishmania* no Alto Douro. *Tese de Doutoramento*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro: 206 pp.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Santos, H., Neto, F. *et al.*, 2006. *Leishmania* e leishmaniose canina: aspectos epidemiológicos, clínicos e de saúde pública. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Ed.) 51 pp.
- Cardoso, P., Souza, M., Sanavria, A., Meira, A., *et al.*, 2009. Flebótomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42:146-150.
- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., *et al.*, 2002. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Tropica*, 83: 83-85.
- Carvalho, G., Brazil, R., Falcão, A. & Filho, J., 2009. Distribuição geográfica do complexo cortelezzii (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil. *Neotropical Entomology*, 38:876-879.
- Carvalho, B., Dias, C. & Rangel, E.F. 2014. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. *Revista Brasileira de Entomologia*, 58(1): 77-87.
- Carvalho, B., Rangel, E., & Vale, M., 2017. Evaluation of the impacts of climate change on disease vectors through ecological niche modelling. *Bulletin of Entomological Research*, 107 (4): 419-430.
- Carvalho, M.R., Valença, H.F., Silva, F.J., Pita Pereira, D. *et al.*, 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil *Acta Trop.*, 116: 108-110.
- Casimiro, E. & Calheiros, J.M., 2002. Human health. In: F.D. Santos, K. Forbes. & R. Moita, ed. *Climate change in Portugal. Scenarios, Impacts and Adaptation Measures- SIAM Project*. Gradiva, Lisboa, 241-300.

- Casimiro, E., Calheiros, J., Santos, F.D., Kovats, S., 2006. National assessment of Human health effects of climate change in Portugal: approach and key findings. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12): 1950-1956.
- Chagas, E., 1936. Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Science*: 397-398.
- Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., *et al.*, 2018. Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change. *Parasites & vectors*, 11(1), 461:1-9.
- Chelbi, I., & Zhioua, E., 2007. Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 44: 597–600.
- Christensen, H.A., Arias, J.R., Vasquez, A.M, & Freitas, R.A., 1982. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 31: 239-242.
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., *et al.* 2012. Re-Emergence of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12, (3): 214–222.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L., 2007. Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1431-2.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L., 2012a. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology* 189, (2): 189-196.
- Cortes S., Esteves, C., Maurício, I., Maia, C. *et al.*, 2012b. In vitro and in vivo behaviour of sympatric *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* and their hybrids. *Parasitology*, 139: 191-199.
- Costa, S. M., Cechinel, M., Bandeira, V., Zannuncio, J., *et al.*, 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil Mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, (2): 149-153.
- Costa, S.M., Cordeiro, J.L.P., Rangel, E.F., 2018. Environmental suitability for *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11: 155.
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V. D. & Otranto, D., 2014. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) *Parasites & Vectors* 479, (1): 7.
- Dedet J.P., 2005. Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis and other tropical diseases. *Parasitologia*, 47: 291–295.
- Dedet, J.P., & Pratlong, F. 2003. Leishmaniasis. In: Cook, G.C. & Zumla, A. (Eds.) *Manson's Tropical Diseases*, London, Saunders, 1339-1364.

- Depaquit, J., Hadj-Henni, L., Bounamous, A., Strutz, S. *et al.*, 2015. Mitochondrial DNA Intraspecific Variability in *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae), *Journal of Medical Entomology*, 52, (5): 819–828.
- Depaquit, J. & Léger, N., 2017. Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In: Duvallet, G., Fontenille, D. & Robert V., *Entomologie médicale et vétérinaire*. Marseille, Versailles IRD Quae 688pp.
- Desjeux, P., & Alvar, J., 2003. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97 (1): 3-15.
- Dias, J.E., Gomes, O.V.O., Silva, J.X. & Goes, M.H.B., 2005. A geodiversidade do Município de Volta Redonda, Rio de Janeiro. *Caminhos de Geografia*, 14(14): 151-160.
- Direção-Geral da Saúde, 2016. *Doenças de declaração obrigatória 2012-2015* volume I-Lisboa, Portugal. Direção-Geral da Saúde, 83 pp.
- D'Urso, V., Ruta, F., Khoury, C., Bianchi, R. *et al.*, 2004. About the presence of *Phlebotomus sergenti* parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in eastern Sicily, Italy. *Parasite*, 11: 279-283
- Dujardin, J.C., 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol.*, 22, (1): 4–6.
- Dujardin, J., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J., *et al.*, 2008. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.*, 14, (7): 1013-1018.
- Dvorak, V. Shaw, J. & Volf, P., 2018. Parasite Biology: The vectors In: Bruschi, F. & Gradoni, L. (Ed.). *Old Neglected Tropical Diseases* Springer, Cham, 1-13.
- Ejov, M. & Dagne, D., 2014. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020. *Organização Mundial de Saúde* (WHO) Regional Office for Europe UN City, Copenhagen Ø, Denmark, 23pp.
- Faleiro, J., Brito, M.J. & Correia, P., 2012. Úlcera cutânea após viagem à Tunísia. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 43: 135-136.
- Ferreira, F.C., 1945. A reacção das precipitinas aplicada aos dípteros do género *Phlebotomus*. *An. Inst. Med. Trop.*, 2: 187-196.
- Ferreira, F.C., & Ferreira, T.G., 1944. Sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *An. Inst. Med. Trop.*, 1: 289-313.
- Ferreira, T., Timbó, R., Minuzzi-Souza, T., Almeida Rocha, M., *et al.*, 2018. High molecular prevalence of *Leishmania* in phlebotomine sand flies fed on chicken blood in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 259: 80-84,
- Ferroglio, E., Romano, A., Dettoni, F., & Trisciuglio, A., 2010. Distribution of *Phlebotomus perniciosus* in North-Italy: a study on 18S rDNA of phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 170: 127-130.

- Ferrolho, J., Maia, C., Gomes, J., Alves-Pires, C., Cristóvão, J.M., Campino, L. & Afonso, M.O., 2015. Rotation of the external genitalia in male Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in laboratory conditions and in captured specimens in Algarve, Portugal. *Acta Tropica*, 150: 1-3.
- Filho, F., Uehara, S., Senefonte, F., Lopes, *et al.*, 2005. Leishmaniose visceral e gestação: relato de um caso. *Rev Bras. Ginecol. Obstet.*, 27: 92-7.
- França, C., 1913. *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 6: 123-124.
- França, C., 1918. Apontamentos para o estudo dos *Phlebotomus* portugueses. *A Medicina Moderna*, 295: 67-68.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., *et al.*, 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 30 137: 214-21.
- Franco, A.O., Davies, C.R., Mylne, A., Dedet, J.-P., Gállego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Gálvez, R., Morillas-Márquez, F., Barón-López, S., Pires, C.A., Afonso, M.O., Ready, P.D. & Cox, J., 2011. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology*, 1878-1891.
- Franco, F.A., Morillas-Márquez, F., Barón, S.D., Morales-Yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Pesson, B., Alves-Pires, C., Depaquit, J., Molina, R., Afonso, M.O., Gállego, M., Guernaoui, S., Bounamous, A., & Martín-Sánchez, J., 2010. Genetic structure of *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *Int. J. Parasitol.*:1335-1346.
- Galati, E.A.B., 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb.* 35,133-142.
- Galati, E.A.B., 2003. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel E.R., & Lainson, R. (Ed). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro Editora Fiocruz, 23–52.
- Galati, E.A.B., 2013. *Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae)* - Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil 138pp.
- Galati, E.A.B., 2016. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos, vol. 1, USP: São Paulo 138pp.
- Gallego, J., Gallego, M., Fisa, R. & Portus, M., 1991. Gynandromorphism in sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with reference to thirty-one new cases in an isolated *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) population. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 51-56.
- Garnham P.C.C., 1965. The Leishmaniasis, with special reference to the role of animal reservoirs. *American Zoologist.*, 5: 141–151.
- Gouveia, C., 2008. Condições Particulares de Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana em Localidades do Campus FIOCRUZ da Mata Atlântica (Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ). *Tese de Mestrado*. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 129 pp.

- Gouveia, S., 2017. A densidade e a variação sazonal de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*, em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial. *Tese de Mestrado*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 116 pp.
- Gouveia, C., de Oliveira, R. M., Zwetsch, A., Motta-Silva, D., *et al.*, 2012. Integrated Tools for American Cutaneous Leishmaniasis Surveillance and Control: Intervention in an Endemic Area in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 1-9.
- Gradoni, L., 2018. A Brief introduction to Leishmaniasis Epidemiology in the Leishmaniasis In: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, F. Bruschi, L. Gradoni (eds.), Springer International Publishing: 1-14.
- Gramiccia, M., Ben-Ismaïl, R. & Gadoni, L., 1991. A *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 370-371.
- Halada, P., Hlavackova, K., Dvorak, V. & Volf, P., 2018. Identification of immature stages of phlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 47-56.
- Hilborne L.H. & Golomb, B.A., 2001. Parasitic diseases. In *A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War Illnesses*. Volume 1: Infectious Diseases. Santa Monica, CA: RAND Corporation: 68-88.
- Hyams, K.C., Riddle, J., Trump. D.H. & Graham. J.T., 2001. Endemic infectious diseases and biological warfare during the Gulf War: a decade of analysis and final concerns. *Am. J. Tropic. Med. Hyg.*, 65, (5): 664-670.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2017. *Estimativas da população residente no Brasil e unidades da federação com data de referência em 1º de julho de 2017*. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE Diretoria de Pesquisas - DPE Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS 11 pp.
- Instituto Nacional de Estatística (INE), 2016. Instituto Nacional de Estatística (Recenseamentos Gerais da População) - [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes)
- Iriso, C.A., Bueno, M.R., De las Heras, E., Lucientes, J. *et al.*, 2017a. Cambio climático en España y su influencia en las enfermedades de transmisión vectorial. *Rev. salud ambient.*, 17, (1): 70-86.
- Iriso, C.A., Tello, A., González-Mora, D. Ángeles Vázquez, M., *et al.*, 2017b. Control del Vector. In: *Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios*. Dirección General de Salud Pública Consejería de Sanidad (Ed). Madrid: 177-190.
- Isenring, E., Isenring, F., Gültekin, J., & Schlagenhaut, P., 2018. Infectious disease profiles of Syrian and Eritrean migrants presenting in Europe: A systematic review *Travel Medicine and Infectious Disease* In press.

- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., *et al.*, 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.*, 112: 2453.
- Kamhawi, S., 2002. The journey of *Leishmania* parasites within the digestive tract of phlebotomine sand flies. In Farrell, J. P. (Ed.): *World Class Parasites: Leishmania*, Volume IV. Kluwer Academic Publishers, U.S.A., 59-73.
- Killick-Kendrick, R., 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 78: 747-755.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 1-24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, 17: 279-289.
- Koch, Lisa K, Kochmann, J., Klimpel, S., Cunze, S., *et al.*, 2017. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Scientific Reports*, 7.
- Lainson, R., 2010. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1: 13-32.
- Lainson, R., Braga, R.R., Souza, A.A., Póvoa, M.M., *et al.*, 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 200-207.
- Lainson, R., & Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press: 12-120.
- Lainson, R., Ward, R.D. & Shaw, J.J., 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, 266: 628-630.
- Lana, R., Michalsky, É., Lopes, L., Lara-Silva F. *et al.*, 2018. Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. *PLOS ONE* 13(10):1-20.
- Lane, R. P., 1993. Medical Insects and Arachnids In: *Medical insects and arachnids* Lane, R.P., Crosskey, R. W. (Ed). London, Chapman & Hall: 78-119.
- Latrofaa, M., Iattaa, R., Dantas-Torres, F., Annosciaa, G., *et al.*, 2018. Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniosis is endemic in southern Italy. *Veterinary Parasitology* 253: 39-42.
- Leng, Y.J., 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, South-West China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 81: 311-317.
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposal for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Sys Entomol.*: 319-332.

- Lima, A.C., 2016. Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania (Viannia) guyanensis/Leishmania (Viannia) shawi shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região Amazônica, Santarém, PA-Brasil. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo: 162pp.
- Lucientes, J., Castillo, J.A., Gracia, M.J. & Peribáñez, M.A., 2005. Flebotomos, de la biología al control. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 8: 1-8.
- Lutz, A., & Neiva, A., 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do género *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 4 (1): 84-95.
- Maia, C., & Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir host of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.*, 27, (8): 341-344.
- Maia, C. & Cardoso, L., 2015. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, 213: 2-11.
- Maia, C. & Depaquit, J. 2016. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal- infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23: 55-69.
- Maia, C., Afonso, M.O., Neto, L.L., Dionísio, L.P. *et al.*, 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *Journal of vector borne diseases*, 46, 4: 268-272.
- Maia, C., Afonso, M.O., Freitas, F.B., Mendonça, J., Cristóvão, J., Almeida, A.P., Campino, L., 2010a. Phlebotomine sand fly vectors of *Leishmania* in the Alqueva dam region, Portugal. European Scientific Conference on applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Lisbon, Portugal. *Abstract book*: 170.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., *et al.*, 2010b. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet. Parasitol.*, 15, (174): 336-40.
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M.O., Neto, L., Cristóvão, J.M. & Campino, L. 2013. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sand flies and canine leishmaniasis in a endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108, (4): 481-7.
- Maia C., Maurício I., Campino L., Cardoso L., Carvalho, L., Afonso, M.O., Neves, R., Brito, T. V., 2011. Primeiro Relatório Regular da LEISHnet. *Veterinary Medicine*, 13: 22-26.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. 2008. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal; *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8, (4): 555-559.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, JM., Freitas, F.B., Afonso, M.O. & Campino, L., 2015. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal *Parasites & Vectors* 8, 173.
- Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*, 2006. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2 ed., Brasília, Editora do Ministério da Saúde, Brasil:182pp.

- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. *et al.*, 2013. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, (2): 123-147.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., *et al.*, 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the 380 canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health*, 13: 256-381.
- Martinez-Ortega, E., Conesa-Gallego, E., & Diaz-Sanchez, F. 1988. Aportacion al conocimiento de los flebotomos (*Diptera: Psychodidae*) de las Islas Canarias. *Rev Iber Parasitai* 48:89–93.
- Marzochi, M.C., Fagundes, A, Andrade, M.V., Souza, M.B. *et al.*, 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 42, (5): 570-80.
- Marzochi, M. C., Marzochi, K. B., Fagundes, A., & Conceição-Silva, F., 2014. A Questão do controle das leishmanioses no Brasil. In *Leishmaniosis do Continente Americano*. FIOCRUZ: 431-464.
- Maurício, I., 2018. *Leishmania* Taxonomy. In: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, F. Bruschi, L. Gradoni (eds.), Springer International Publishing: 15-30.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Van Bortel, W., Zeller, H. *et al.*, 2014. A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) of public health importance. *J. Vector Ecol.*, 39, (1): 72-7.
- Meira, M. & Ferreira, T., 1944. Espèces de Phlébotomes de Lisbonne et de ses environs. *An. Inst. Med. Trop.*, 1: 269- 287.
- Mendonça, J., 2011. Risco de introdução de novas espécies de *Leishmania* na região do Algarve. *Tese de Mestrado*, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 79 pp.
- Miguel, R., 2017. Flebotomíneos (*Diptera, Psychodidae*) em Área rural, do concelho de Palmela: variação sazonal e risco de transmissão vetorial de *Leishmania* sp. *Tese de Mestrado*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical Universidade, Nova de Lisboa: 137 pp.
- Ministério da Saúde, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora MS. 113pp
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Goncalves, M., *et al.*, 2002. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, (2): 185-8.
- Miranda, J.C., Secundino, N.F., Nieves, E., Souza, A.P., *et al.*, 2008. Studies of the influence of the presence of domestic animals on increasing the transmission probabilities of leishmaniasis. *Ann Med Entomol.*, 17: 9–15

- Miró, G., Troyano, A., Montoya, A., Fariñas, F., *et al.*, 2018. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 11, 185: 1-7.
- Momen, H., & Cupolillo, E., 2000. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, (4): 583-588.
- Moureau, G., Ninove, L., Izri, A., Cook, S., *et al.*, 2010. Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10, (2): 195-197.
- Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., *et al.*, 2017. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, (8):1-19.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., & Volf, P., 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9, (3): 317-324.
- Naucke, T.J., & Lorentz, S., 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5: 55-67.
- Naucke, T.J., Amelung, S. & Lorentz, S., 2016. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, 9: 1-4.
- Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D. & Lorentz, S., 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology Research* 103: 65-68.
- Neves, D. P., Melo, A.L., Genaro, O. & Linardi, P. M., 1997. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu: 402 pp.
- Nieves, E. & Pimenta, P.F., 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67: 640-647.
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C.R., Llanos-Cuentas, A. *et al.*, 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (viannia)* in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 573-578.
- OMS, 2010. Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, *WHO Technical Report Series*, 949. Genève: 243pp.
- OnLeish, 2010. *OnLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses*. Encontro de formação da Ordem dos Veterinários, Outubro de 2010, Monte da Caparica, Portugal.
- Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M., Fernandes, O. *et al.*, 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, (1): 19-20.
- Peña, V.H., Fernández, G.J., Gómez-Palacio, A.M., Mejía-Jaramillo, A.M., *et al.*, 2012. High-resolution melting (HRM) of the cytochrome B gene: a powerful approach to identify blood-meal sources in Chagas disease Vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6. (2): 1-9.

- Pennisi, M.G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P. *et al.*, 2015. LeisVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 8: 302 DOI 10.1186/s13071-015-0909-z
- Pereira, M., Afonso, M.O., Nave, A., Sousa, M.C., 2010. Identificação de *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 no concelho de Coimbra, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 17 (10): 45-49.
- Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L. & Afonso, M.O., 2017. First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal, *Acta Tropica*, 174:45-48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020>
- Peterson, A. & Shaw, J., 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology*, 33 (9): 919-931.
- Peterson, A., Campbell, L., Moo-Llanes, D., Travi, B. *et al.*, 2017. Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). *International Journal for Parasitology* 47: 667-674.
- Pimenta, F.P., Nágila, F.C. & Blanco, E.E.N., 2003. Interação Vetor-Hospedeiro. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Ed.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 275-289.
- Pires, C.A., 1979. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (Diptera, Psychodidae). *Bolm. Soc. Port. Ciênc. Nat.* 19 : 197- 210.
- Pires, C.A., 1984. Les phlébotomes du Portugal I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59: 521-524.
- Pires, C.A., 1985. Os flebótomos de Portugal (Insecta, Diptera, Psychodidae). Distribuição, variação anual e altitudinal dos flebótomos do foco zoonótico da Arrábida. *Actas do II Congresso Ibérico de Entomologia*, 1: 83-94.
- Pires, C.A., 2000. Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. *Tese de Doutoramento*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 228 pp.
- Pires, C.A., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes, G., *et al.*, 2001. Les phlébotomes du Portugal X – Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite* 8: 374-375.
- Pires, C.A., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., *et al.*, 1991. Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol.*, 66, (1) : 47-48.
- Pires, C.A., Tang, Y., Killick-Kendrick R., 1997. *Didilia* sp. (Tetradonematidae: Mermithoidea: Nematoda) a parasite of *Phlebotomus sergenti* in Portugal. *Parasite*, 2: 191-192.

- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., *et al.*, 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99, (12): 905-13.
- Pita-Pereira D., Souza G.D., Zwetsch, A., Alves, C.R., *et al.*, 2008. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (V.) braziliensis* in a periurban area of South Brazil, State of Rio Grande do Sul, using a PCR multiplex assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 593-95.
- Poepl, W., Obwaller, A.G., Weiler, M., Burgmann, H. *et al.*, 2013. Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. *Parasitol. Res.*, 112: 4231-4237.
- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., *et al.*, 2015. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France) *Parasites & Vectors*, 8: 642-656.
- Pugedo, H., Barata, R.A., França-Silva, J.C., Silva, J.C. *et al.*, 2005. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38: 70-72.
- Rabello, A., Orsini, M., & Disch, J., 2003. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97, (1): 17-28.
- Rangel, E.F. & Lainson, R., 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz, 367 pp.
- Rangel E.F. & Lainson R., 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104, (7): 937-954.
- Rangel, E.F., & Vilela, M.L., 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24, (12): 2948-2952.
- Rangel, E.F., Barbosa, A.F., Andrade, C.A, Souza N.A. *et al.*, 1992. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 235-238.
- Rangel, E.F., Lainson, R., Carvalho, B.M., Costa, S.M. *et al.*, 2018. Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In *Brazilian Sand Flies*, Springer International Publishing, E.F. Rangel, J.J. Shaw (Eds.), FIOCRUZ: 341-380.
- Rangel, E.F., Souza, N.A., Wermelinger, E.D., Barbosa, A.F., 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva. 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 395-396.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F. *et al.*, 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International journal for Parasitology*, 36: 1383-1388.

- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15: 1-11.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 227-250.
- Ready, P., Lainson, R., Shaw, J., Ward, R., 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 76, (1): 21-40.
- Regina-Silva, S., Feres, A.M.L.T., França-Silva, J.C., Dias, E.S., Michalsky, E.M., Andrade, H.M., Coelho, E.A.F., *et al.*, 2016. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec<sup>®</sup> vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019>
- Rés, J.F., 1957. Contribuição para o conhecimento da leishmaniose em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 14: 527-545.
- Rioux, J.A., Carron, S., Dereure, J., Périères, J., *et al.*, 2013. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region), *Parasite*, 20: 34-44.
- Rispal, R. & Léger, N., 1998. Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). I. Considerations of Morphological Characters in the genus *Phlebotomus* Rondani & Berte. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93: 793-785.
- Risueño, J., Ortuño, M., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., *et al.*, 2018. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. *Veterinary Parasitology*, 259: 61-67,
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A., & Campino, L., 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12:183-186.
- Sacks, D.L., Hieny, S., Sher, A., 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.*, 135: 564-569.
- Salomón, O.D., Feliciangeli, M.D., Quintana, M.G., Afonso M.M. *et al.*, 2015. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, (7): 831-846.
- Sangenis, L.H., Sebastião, R., Cíntia, D., Mello, J., *et al.*, 2014. Expansion of visceral leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56: 271-274.
- Sanger, F. & Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94: 441-448.
- Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., *et al.*, 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, 12: 315-317.

- Santos, L., Simões, J. Costa, R. Martins, S. & Lecour, H., 2007. Toscana vírus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill.*, (1), 12: 3-4.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. & Muller, G. C., 2001. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65: 300-303.
- Schrey, C., Pires, C. & Macvean, D., 1989. Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 125-30.
- Semião-Santos, S.J., Harith, A.E., Ferreira, E., Pires, C.A, *et al.*, 1995. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol. Research*, 81: 235-239.
- Serafim, T., Coutinho-Abreu, I., Oliveira, F., Meneses, C., *et al.*, 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, 3: 548-555.
- Service, M.W., 2001. Phlebotomine sand-flies (Phlebotominae) In: *The Encyclopedia of Arthropod transmitted Infections*. Wallingford: CABI Publishing: 395-397.
- Shaw, J., 1993. Taxonomy of the genus *Leishmania*. Present and future trends and their implications. In S Brandão-Filho, *Research and control of leishmaniasis in Brazil*. Proceedings of a National Workshop. Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisas, Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brazil: 7-18.
- Shaimabuku, P.H.F., Tolezano, J.E. & Galati, E.A.B., 2011. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Pap. Avulsos Zool.* (São Paulo), 51, 27: 399-441.
- Singh, S., 2006. New developments in diagnosis of Leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, 123: 311-30.
- Silva, D., Madeira, M.F., & Figueiredo, F.B., 2015. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 57 (5): 435-438.
- Souza, A.A.A., Barata, I.R., Silva, M.G.S., Lima, J.A.N., *et al.*, 2017. Natural *Leishmania* (*Viannia*) infections of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) indicate classical and alternative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis in the Guiana Shield, Brazil. *Parasite*, 24, 13: 1-13.
- Souza, N.A., Andrade-Coelho, C.A., Vilela, M.L., Peixoto, A., *et al.*, 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 759-765.
- Souza, M.B., Cardoso, P.G., Sanavria, A., Marzochi, M.C.A., *et al.*, 2003. Fauna flebotomínica do município de Bom Jardim, Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol.*, 12, (4): 150-153.
- Trájer, A.J., Bede-Fazekas, Á., Hufnagel, L., & Horváth, L., 2013. The effect of climate change on the potential distribution of the european *Phlebotomus* species. *Applied Ecology and Environmental Research*, 11, (2): 189-208.

- Vilela, M.L., Rangel, E.F., Lainson, R., 2003. Métodos de coleta e preservação de flebotomíneos In Rangel, E.F. & Lainson, R., *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz: 367 pp.
- Vilela, M.L., Pita Pereira, D., Graser Azevedo, C., Godoy, E.R., *et al.*, 2013. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 578-585.
- Vilela, M.L., Afonso, M.M., Costa, S.M., Costa, W.A. & Rangel, E.F., 2014. Capítulo 10. *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: fatores associados ao processo de expansão e urbanização a leishmaniose visceral americana. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Conceição-Silva, F. & Alves, C.R., Fiocruz, Rio de Janeiro:183-192.
- Vilela, M.L., Pita-Pereira, D., Araújo-Pereira, T., Cristóvão, J.M., Maia, C., Campino, L., Magalhães, M., Rangel, E.F. & Afonso, M.O., 2016a. First study of Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae), vectors of *Leishmania*, in Castelo Branco District, Central-East Region, Portugal. IX International Symposium on Phlebotomine sandflies (ISOPS IX), Reims, France, June 28th - July 1st, *Abstract book*: 29 and *Parasite*, 2016, 23, E1: 24.
- Vilela, M.L., Rangel, E.F., Pita-Pereira, D., Araújo-Pereira, T., Cristóvão, J.M., Maia, C., Campino, L., Magalhães, M. & Afonso, M.O., 2016b. Distribuição e abundância relativa de flebotomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania* sp., no Distrito de Castelo Branco, Portugal. Realização do primeiro estudo flebotomínico. XVII Congresso Ibérico de Entomologia, Lisboa, Portugal, 6-8 setembro, *Abstract book*: 17.
- Volf, P. & Myskova, J., 2007. Sandflies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23: 91-92.
- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., *et al.*, 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International journal for parasitology*. 37, (6): 589-593.
- Young, D.G., 1979. A Review of the Bloodsucking Psychodid Flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae), *Tech. Bull.* 806, Agric. Univ. Florida, Gainesville: 226 pp.
- Young, D.G. & Duncan, M.A., 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Inst Entomol* 54, Associate Publishers, Gainesville: 881pp.
- Willen, L., Mertens, P., Volf, P., 2018. Evaluation of the rSP03B sero-strip, a newly proposed rapid test for canine exposure to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 12 (8): e0006607. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006607>

## 6. Anexos

### Anexo I

Ficha de Campo

Ficha Nº -----

#### Flebótomos – Ficha de Campo

1. **Data:** \_\_\_\_\_ **Hora:** Colocação \_\_\_\_\_ Retirada \_\_\_\_\_
2. **Distrito:** \_\_\_\_\_ **Concelho:** \_\_\_\_\_ **Freguesia:** \_\_\_\_\_ **Localização:** \_\_\_\_\_
- Latitude: \_\_\_\_\_
- Longitude: \_\_\_\_\_
- Altitude: \_\_\_\_\_

### 3. Características Atmosféricas:

Temperatura: \_\_\_\_\_

Humidade: \_\_\_\_\_

Humidade aparente: \_\_\_\_\_

- |                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Seco        | <input type="checkbox"/> Húmido       |
| <input type="checkbox"/> Semi húmido | <input type="checkbox"/> Muito húmido |

Velocidade vento: \_\_\_\_\_

Chuva: \_\_\_\_\_

### 4. Tipo de formação superficial

- |  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Solo calcário | <input type="checkbox"/> Solo terroso |
| <input type="checkbox"/> Solo argiloso | <input type="checkbox"/> Outro        |
| <input type="checkbox"/> Solo arenoso  |                                       |

### 5. Características fitogeográficas

- |                                       |                                     |   |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Videira      | <input type="checkbox"/> Carvalho   | <input type="checkbox"/> Horta familiar     |
| <input type="checkbox"/> Azinheira    | <input type="checkbox"/> Figueira   | <input type="checkbox"/> Cultura de cereais |
| <input type="checkbox"/> Alfarrobeira | <input type="checkbox"/> Pinheiro   | <input type="checkbox"/> Outro              |
| <input type="checkbox"/> Sobreiro     | <input type="checkbox"/> Eucalipto  |   |
| <input type="checkbox"/> Oliveira     | <input type="checkbox"/> Frutíferas |   |

**6. Local de captura**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Casa – interior/exterior          | <input type="checkbox"/> Buraco nas rochas/muro |
| <input type="checkbox"/> Abrigo animal – interior/exterior | <input type="checkbox"/> Troncos de árvores     |
| <input type="checkbox"/> Abrigo artificial                 | <input type="checkbox"/> Pátio/Terraço          |
|  | <input type="checkbox"/> Outro                  |

**7. Animais existentes/quantidade**

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Cão/nº               | <input type="checkbox"/> Gado ovino                                  |
| <input type="checkbox"/> Gato/nº              | <input type="checkbox"/> Outros animais domésticos/nº                |
| <input type="checkbox"/> Aves de capoeiras/nº | <input type="checkbox"/> Animais silváticos:<br>visíveis/comunicados |
| <input type="checkbox"/> Coelhos/nº           |  |
| <input type="checkbox"/> Gado bovino          |  |

**8. Presença/Ausência de coleira inseticida nos animais domésticos**

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Com coleira/ marca | <input type="checkbox"/> Sem coleira |
|---|--------------------------------------|

**9. Observações:**

Sara Pereira Doutorado em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia (adaptado de Branco, 2011)

**Anexo II**

Ficha de Campo Volta Redonda

Ficha Nº -----

**BOLETIM DE CAPTURA DIÁRIA**      Nº da ficha: \_\_\_\_\_

<p>Município: <input type="text"/></p> <p>Localidade: <input type="text"/></p> <p>Endereço: <input type="text"/></p> <p><input type="text"/></p> <p>Morador: <input type="text"/></p> <p>Lat: <input type="text"/> Long: <input type="text"/> Alt: <input type="text"/></p> <p>Dia: <input type="text"/> Mês: <input type="text"/> Ano: <input type="text"/></p> <p><b>Categoria:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Bairro                      <input type="checkbox"/> 1. Urbana  <input type="checkbox"/> 2. Fazenda                    <input type="checkbox"/> 2. Periurbana  <input type="checkbox"/> 3. Vila                            <input type="checkbox"/> 3. Rural  <input type="checkbox"/> 4. Povoado                    <input type="checkbox"/> 4. Rural-urbana  <input type="checkbox"/> 5. Sítio  <input type="checkbox"/> 6. Cidade</p> <p><b>Vegetação:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Mata esparsa              <input type="checkbox"/> 1. Alvenaria  <input type="checkbox"/> 2. Campo/pasto              <input type="checkbox"/> 2. Madeira  <input type="checkbox"/> 3. Área de cultivo            <input type="checkbox"/> 3. Bambú  <input type="checkbox"/> 4. Mata densa                <input type="checkbox"/> 4. Estuque  <input type="checkbox"/> 5. Cidade arborizada</p> <p><b>Coleta de Lixo:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Regular  <input type="checkbox"/> 2. Queima  <input type="checkbox"/> 3. Enterra  <input type="checkbox"/> 4. Outros</p> <p><b>Ambiente:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Descrição</th> <th>Distância da Casa</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>( ) galinheiro</td> <td></td> </tr> <tr> <td>( ) curral</td> <td></td> </tr> <tr> <td>( ) pocilga</td> <td></td> </tr> <tr> <td>( ) canil</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Presença de árvores (frutíferas): S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>                  Qual(is): _____</p>	Descrição	Distância da Casa	( ) galinheiro		( ) curral		( ) pocilga		( ) canil		<p><b>Instrumento de Captura:</b>  <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1. Armadilha Shannon com luz  <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 2. Armadilha Shannon com isca  <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 3. CDC (luminosa)  <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 4. Tubo de sucção  <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 5. Exposição humana (invol.)</p> <p><b>Quantidade de armadilhas:</b> _____                  Intra _____ Peri _____ Extra _____</p> <p><b>Local da captura:</b>                      <b>IC</b>                      <b>Qde</b></p> <p>1. Abrigo de galináceo _____                  2. Dentro de casa _____                  3. Paredes internas de casa _____                  4. Paredes externas _____                  5. Abrigo de suínos _____                  6. Abrigo de caprinos _____                  7. Margem de mata _____                  8. Interior de mata _____                  9. Abrigo de cão _____                  10. Abrigo de muar/equino _____                  11. Margem de rio/córrego _____                  12. Margem de lago/lagoa _____                  13. Ocos de árvores _____                  14. Fendas em pedras _____                  15. Outros _____</p> <p>Número de capturadores: <input type="text"/></p> <p>Tempo de procura ou exposição: <input type="text"/></p> <p><b>Nº Tubito</b>                      <b>Local de captura</b></p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p><b>Modalidade de captura</b>  <input type="checkbox"/> 1. Monitoramento    2. Pesquisa em foco  <input type="checkbox"/> 3. Levantamento       4. Investigação</p> <p><b>Tempo meteorológico:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Chuva fraca    2. Sem chuva    3. Tempo instável</p> <p><b>Umidade relativa do ar:</b>                  Inicial <input type="text"/> Final <input type="text"/></p> <p><b>Temperatura:</b>                  Inicial <input type="text"/> Final <input type="text"/></p> <p><b>Concentração de nuvens:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Céu limpo            2. Parcialmente nublado  <input type="checkbox"/> 3. Nublado               4. Instável</p> <p><b>Vento:</b>                      <b>Lua:</b>  <input type="checkbox"/> 1. Nulo                    <input type="checkbox"/> 1. Nova            2. Crescente  <input type="checkbox"/> 2. Fraco                   <input type="checkbox"/> 3. Cheia           4. Minguante  <input type="checkbox"/> 3. Forte  <input type="checkbox"/> 4. Muito forte</p> <p><b>Horário:</b> Inicial <input type="text"/> Final <input type="text"/></p> <p><b>Distância da mata:</b> <input type="text"/></p> <p><b>Aplicação de inseticida:</b> <input type="checkbox"/> 1. Sim    2. Não</p> <p><b>Data da última aplicação:</b> <input type="text"/></p> <p><b>Inseticida:</b> <input type="checkbox"/> 1. Carbamatos    2. Clorados  <input type="checkbox"/> 3. Piretróides      4. Fosforados</p> <p><b>Outras observações:</b> _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
Descrição	Distância da Casa											
( ) galinheiro												
( ) curral												
( ) pocilga												
( ) canil												