



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

BASE AVANÇADA NO MUNICÍPIO DE NOVA LIMA, ESTADO DE MINAS GERAIS

Rodovia BR 450, Km 8,5 – Via EPIA, - Brasília - CEP 70635-800

Telefone: (61)20289792

PLANO DE TRABALHO - PIBIC/ICMBIO

17º EDITAL DE SELEÇÃO - CICLO 2023/2024



Título do Plano de Trabalho: Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em ecossistemas espeleológicos de Unidades de Conservação e possíveis implicações na ecoepidemiologia das leishmanioses.

Resumo:

Estudos bioespeleológicos têm se tornado cada vez mais comuns no Brasil, possibilitando a descoberta de inúmeras espécies troglóbias ou troglomórficas e registros comportamentais nunca descritos pela ciência. Apesar disso, estudos ligados ao licenciamento envolvendo a supressão de cavidades naturais subterrâneas (CNS), seja por questões logísticas ou outros fatores, tendem a priorizar espécimes troglóbios e troglófilos. Nesse contexto, outros grupos classificados como troglóxenos acabam sendo negligenciados, mesmo sendo importantes para determinação do grau de relevância das CNS. Sabidamente, algumas espécies de vertebrados troglóxenos atuam como reservatórios de espécies de *Leishmania* causadoras das leishmanioses, as quais são transmitidas por fêmeas de flebotomíneos. Das 277 espécies de flebotomíneos que ocorrem no Brasil, 144 (52%) já foram registradas em cavernas e 16 (6%) novas espécies foram descritas a partir desses ecótopos. Daquele total, 21 (8%) são conhecidas como potenciais vetoras de *Leishmania* spp., sendo que 13 (60%) apresentam alguma relação com CNS. Acredita-se que algumas espécies possam manter todo seu ciclo de vida em ambiente hipógeo, ou próximo a ele, possibilitando a circulação e manutenção de *Leishmania* spp. entre vertebrados que utilizam esses habitats. Dessa forma, para que uma caverna e seu entorno possam ser caracterizados como áreas de risco potencial para a ocorrência de casos de leishmanioses, relações ecológicas e evolutivas devem ser esclarecidas. Embora ocorra uma maior estabilidade ambiental e climática nas áreas protegidas e sobretudo nas cavernas, o mesmo não acontece nas áreas contíguas as UCs, devido as ações antrópicas. As “doenças transmitidas por artrópodes” (*artropod borne-disease*) são suscetíveis a alterações ambientais e climáticas, visto que sua ocorrência dependerá do balanço ecológico entre diferentes espécies envolvidas nos ciclos de transmissão. Um dos impactos das crescentes mudanças ambientais e climáticas na ecoepidemiologia das leishmanioses é a ampliação da distribuição geográfica dos flebotomíneos vetores e dos vertebrados reservatórios desses parasitos. Dessa forma, o presente estudo pretende revisar e listar as espécies potenciais vetoras de *Leishmania* já registradas

em cavernas, abertas a visitação pública, de três UCs do Brasil, sendo pelo menos duas federais, além de inventariar a fauna de flebotomíneos na Gruta da Lancinha, situada em um Monumento natural do estado do Paraná, destacando a importância de conservação do patrimônio espeleológico e do seu uso seguro e adequado no espeleoturismo. Ademais, será elaborado um mapa de calor (densidade de Kernel) para cada UC e região analisada, referente ao potencial risco a aquisição de leishmanioses. De modo complementar, espera-se determinar o possível papel da Gruta da Lancinha na manutenção de ciclos de *Leishmania*, através do conhecimento dos vertebrados utilizados como fonte sanguínea e identificar potenciais zonas de risco, no interior e entorno da CNS, para infecção. As capturas serão realizadas utilizando armadilhas luminosas e coletas manuais. Machos e fêmeas serão identificados a nível específico e depositados em coleções biológicas. Para a detecção de *Leishmania* spp. nas fêmeas não ingurgitadas será realizada extração de DNA e submetidas à PCR para posterior sequenciamento. Fêmeas ingurgitadas serão destinadas ao estudo de fonte alimentar utilizando o protocolo de HotSHOT, direcionado para oligonucleotídeos referentes ao gene mitocondrial COI de vertebrados das classes Amphibia, Reptilia, Aves e Mammalia, para posterior PCR e sequenciamento. Trata-se de um estudo pioneiro visto que na Região Sul, não existem trabalhos que investiguem a fauna flebotomínica e o risco de aquisição de leishmanioses em cavernas. O estudo irá contribuir no mapeamento das espécies vetoras de leishmanioses presentes em cavernas das UCs analisadas, no aumento da biodiversidade de flebotomíneos no estado do Paraná e subsidiará a proposta de plano de manejo espeleológico da Gruta da Lancinha. Ainda, e de forma também pioneira, irá proporcionar condições para a geração de mapas de potencialidade de risco a leishmanioses para cada UC analisada, servindo como ferramenta de gestão aos órgãos públicos ambientais e municipais de saúde, assim como modelo piloto a ser aplicado, posteriormente, a nível nacional.

Grande Área do Conhecimento

<input type="checkbox"/> Ciências Exatas e da Terra	<input type="checkbox"/> Ciências da Saúde	<input type="checkbox"/> Ciências Humanas
<input checked="" type="checkbox"/> Ciências Biológicas	<input type="checkbox"/> Ciências Agrárias	<input type="checkbox"/> Linguística, Letras e Artes
<input type="checkbox"/> Engenharias	<input type="checkbox"/> Ciências Sociais Aplicadas	<input type="checkbox"/> Outras áreas

Orientador: Júlio César Rocha Costa
Unidade do orientador: BAV CECAV-MG
Coorientador: Andrey José de Andrade
Instituição do coorientador: UFPR
Estudante: Mariana Funchal Gusso
Instituição do Estudante (Cidade/UF): UFPR (Curitiba/PR)
Curso de graduação e semestre atual do estudante: Ciências Biológicas (5º período)

Escolha do(s) tema(s):	Temas estratégicos de pesquisa - Conforme anexo I do 17º Edital PIBIC - 2023/2024
X	1 - Valorização da biodiversidade, serviços ecossistêmicos e patrimônio espeleológico e arqueológico
	2 - Manejo integrado e adaptativo do fogo

	3 - Recuperação de habitats terrestres e aquáticos
	4 - Manejo de espécies exóticas invasoras
	5 - Boas práticas e regulação do uso de fauna
	6 - Diagnóstico das atividades e cadeias econômicas responsáveis pela exploração predatória e/ou ilegal dos recursos da biodiversidade
	7 - Fortalecimento das cadeias produtivas de produtos madeireiros e não-madeireiros em unidades de conservação e em seu entorno
	8 - Avaliação do estado de conservação das espécies da fauna e flora brasileiras e melhoria do estado de conservação das espécies categorizadas como ameaçadas de extinção (Criticamente em Perigo - CR, Em Perigo - EN, Vulnerável - VU) e com Dados Insuficientes (DD)
	9 - Monitoramento participativo dos recursos naturais e dos compromissos estabelecidos para a gestão das UC e conservação e uso da biodiversidade
X	10 - Gestão da informação sobre a biodiversidade para subsidiar das ações de conservação
X	11 - Identificação e monitoramento de impactos de atividades antrópicas sobre a biodiversidade e medidas de mitigação que afetem UCs ou espécies da fauna ameaçada
X	12 - Planejamento e implementação de Unidades de Conservação
	13 - Criação ou ampliação de unidades de conservação e conectividade

Indique - assinalando com um **X** - o(s) tema(s) no qual a proposta está inserida:

1- INTRODUÇÃO:

De maneira geral e historicamente, os estudos bioespeleológicos ligados a fauna têm dado maior ênfase às espécies troglóbias e troglófilas, desconsiderando muitas vezes os demais componentes da fauna, entre eles alguns invertebrados e vertebrados troglótenos. Contudo, no contexto atual da crescente supressão de cavidades naturais para exploração minerária é evidente e torna-se urgente a necessidade de avaliar toda a riqueza faunística associada a este tipo de ambiente, uma vez que para proposição de medidas de conservação e manejo de cavernas faz-se necessário um conhecimento mais amplo e ecológico de toda comunidade faunística associada (SHARRAT *et al.* 2000, SOUZA-SILVA *et al.* 2011). Segundo Rocha *et al.* (2004), a presença de Unidades de Conservação (UCs) favorece a proteção das cavernas nelas inseridas atenuando impactos causados por ações antrópicas e promovendo um planejamento adequado para uso continuado. No rito do licenciamento e de acordo com a Instrução normativa nº 2/2017, os levantamentos bioespeleológicos são extremamente importantes para determinação do grau de relevância das cavidades naturais subterrâneas, pois considera, além de outros dados, a riqueza de espécies registradas, o grau de endemismo e de ameaça.

Neste contexto, a presença de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) em cavernas no país vem sendo estudada apenas recentemente, sendo os primeiros registros datados no final da década de 90 e impulsionados a partir do ano seguinte (GALATI *et al.* 2003, 2010; BARATA; APOLINÁRIO 2008). Ainda assim, é incipiente o conhecimento sobre a relação dos flebotomíneos com as cavidades naturais subterrâneas e com sua fauna associada. Apesar de atualmente alguns estudos, no Brasil, relatarem a ocorrência destes insetos neste tipo de ambiente, os registros das espécies ocorrem de forma pontual, não considerando os aspectos ecológicos e/ou comportamentais das espécies descritas, como apontado por Andrade *et al.* (2002) e Dutra-Rêgo *et al.* (2022). Além disso, são raras as pesquisas que realizaram algum tipo de monitoramento da ocorrência de flebotomíneos nas cavidades de registro (ANDRADE *et al.* 2002), bem como da fonte sanguínea utilizada pelas fêmeas (COSTA *et al.* 2021). Sabe-se que, estudos de monitoramento de fauna cavernícola são de extrema relevância, tendo em vista que várias espécies já registradas em cavernas podem atuar como vetoras ou mesmo reservatórios de importantes zoonoses como, por exemplo, as leishmanioses (SANTOS *et al.* 2017, CAMPOS *et al.* 2020).

Apesar da esperada maior estabilidade ambiental e climática nas áreas protegidas e sobretudo nas cavernas, o mesmo, muitas vezes, não ocorre nas áreas contíguas as UCs, devido, principalmente, ao desmatamento e consequente alteração do uso e ocupação do solo. Salienta-se que, as “doenças transmitidas por artópodes” (*artropod borne-disease*) são particularmente suscetíveis a alterações ambientais e climáticas, uma vez que sua ocorrência depende do balanço ecológico entre diferentes espécies envolvidas nos ciclos de transmissão das leishmanioses (RANGEL *et al.* 2018).

Os patógenos veiculados por artrópodes são um problema relevante de saúde pública, sendo os insetos da subfamília Phlebotominae um dos mais importantes grupos de vetores estudados (ANDRADE *et al.* 2020). A subfamília possui 1.051 espécies descritas distribuídas mundialmente (SHIMABUKURO *et al.* 2017, CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022) e são os transmissores comprovados de protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses. Essas doenças são negligenciadas e colocam sob risco de infecção 350 milhões de pessoas, gerando mais de dois milhões de novos casos anualmente (OMS 2018), sendo que em torno de 70.000 são registrado nas Américas e desses, aproximadamente 30.000 (43%) ocorrem no Brasil (ALVAR *et al.* 2012). A ecoepidemiologia das leishmanioses está intimamente ligada à diversidade e abundância de espécies de flebotomíneos, cuja dinâmica populacional é afetada por fatores abióticos, como pluviosidade, umidade e temperatura. Essas variáveis influenciam na suas distribuição, bem como o metabolismo e interações com parasitos do gênero *Leishmania* (OSHAGHI *et al.* 2009, SALOMÓN *et al.* 2012). Especialistas relatam que um dos impactos das crescentes mudanças ambientais e climáticas na ecoepidemiologia das leishmanioses seja a ampliação da distribuição geográfica dos vetores e reservatórios (MENDES *et al.* 2016). O registro de algumas espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia longipalpis*, pode indicar que o ambiente se encontra antropizado (FERNANDES *et al.* 2022). Ainda, a fim de mitigar lacunas na ecoepidemiologia de diversas doenças relacionadas à insetos vetores, análises moleculares vem sendo empregadas no que tange a estudos de infectividade, fontes alimentares ou mesmo microbioma desses insetos (TELANG *et al.* 2018, OMONDI; DEMIR, 2021).

Nesse sentido, para flebotomíneos, estudos de sua bionomia e dos habitats ocupados pelas espécies, aliados à presença (ou não) de agentes patogênicos e dos recursos alimentares têm gerado informações relevantes para os programas de vigilância e controle de vetores (PAIVA *et al.* 2007; PITA-PEREIRA *et al.* 2009; LIDANI *et al.* 2017). Entretanto, não existem relatos publicados de cavernas atuando efetivamente como áreas de risco para aquisição de leishmanioses no Brasil. Isso provavelmente se deve a possíveis subnotificações de casos, visto que, embora sejam doenças de notificação obrigatória; na ficha do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), do Ministério da Saúde, cavernas não constam como locais prováveis de infecção (LPI). Relatos informais de casos de leishmaniose tegumentar entre espeleólogos já foram registrados (ANDRADE *et al.* 2022). Em 2021, Siller Junior *et al.* relataram o caso de um turista da Califórnia que adquiriu a forma cutânea da doença após visitar uma caverna no México, tratando-se da única notificação publicada para as Américas.

Nas cavernas, as larvas de flebotomíneos podem utilizar, como fonte de alimento, tanto o material vegetativo carreado, o guano de morcegos e de aves presentes, bem como as excretas de outros vertebrados, carcaças e o exoesqueleto de invertebrados. Na fase adulta, somente as fêmeas são hematófagas e cavernas abrigam variadas fontes alimentares, como morcegos, roedores, aves, lagartos, anfíbios e outros vertebrados. Assim, nesses ambientes, as espécies podem manter uma relação com esses vertebrados, quer seja utilizando fezes (guano) como criadouros (ALVES *et al.* 2011, BARATA; APOLINÁRIO, 2012) ou realizando a comprovada hematofagia nesses animais (COSTA *et al.* 2021). Ainda, as várias compartimentações no interior das cavernas também poderiam servir de criadouros ou de refúgio para as formas aladas.

No Brasil, flebotomíneos vêm sendo capturados em cavernas de diferentes litotipos rochosos, de acordo com o Mapa de Potencialidade de Ocorrências de Cavernas no Brasil (JANSEN *et al.* 2012). Todas as regiões, em pelo menos um estado, possuem cavernas exploradas com registro desses insetos (ANDRADE *et al.* 2022). Entretanto, a maioria desses estudos tendem apenas a inventariar a fauna flebotomínica (GALATI *et al.* 2003, BARATA *et al.* 2008, CARVALHO *et al.* 2013, MONTEIRO *et al.* 2016), ocorrendo um menor número de

observações visando a detecção de espécies de *Leishmania* circulantes (OGAWA *et al.* 2016, CARVALHO *et al.* 2017, ALMEIDA *et al.* 2019), e, menos ainda, sobre as fontes alimentares utilizadas (COSTA *et al.* 2021). Conforme já exposto, flebotomíneos cavernícolas vem sendo alvo de pesquisas associadas à detecção de DNA de *Leishmania*. Somente um estudo identificou a fonte sanguínea de espécies capturadas em cavernas, sendo uma delas uma nova espécie (COSTA *et al.* 2021), posteriormente descrita como *Sciopemyia shimabukuroae* (CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022).

Não há pesquisas com flebotomíneos em cavernas na região Sul do Brasil. Assim, o projeto propõe, a partir da amostragem da Gruta da Lancinha, situada em uma UC estadual, trazer novas perspectivas sobre o conhecimento da fauna de flebotomíneos associada às cavernas do Paraná, possibilitando a descoberta de novas espécies ou mesmo novos registros que terá impacto na biodiversidade do grupo, além de melhorar o conhecimento e conservação do patrimônio espeleológico estadual, visando atender aos componentes 1, 2 e 4 do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (Portaria MMA nº 358 de 30/09/2009). Somado a isso, as análises moleculares para detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas das espécies de flebotomíneos encontradas na UC, sinalizarão, preventivamente, áreas de potencial risco para infecção humana por leishmanioses. Já a identificação de potenciais hospedeiros reservatórios que habitam esses locais, fornecida pela fonte alimentar utilizada por essas fêmeas, permitirá o acesso a dados ecoepidemiológicos importantes e, em sua maioria, desconhecidos pela comunidade científica.

Ainda, de forma inédita, modelos de mapas de áreas de potencial risco às leishmanioses serão elaborados para cada UC previamente amostrada, a partir de estudos previamente publicados e coleções científicas que registraram, em cavernas, espécies flebotomínicas classicamente conhecidas como potenciais vetoras de *Leishmania* spp. (READY 2013). Associado a esses registros estarão as notificações municipais regionais onde ocorreram casos de leishmanioses nos últimos cinco anos. Dessa forma, será prestado um modelo protocolar de serviço preventivo e de utilidade aos órgãos ambientais ligados às atividades de gestão, espeleoturismo e de licenciamento espeleológico.

2 - OBJETIVOS GERAIS DO PLANO DE TRABALHO:

- Revisar a fauna de flebotomíneos coletada em ambientes cavernícolas e entorno, situados em três UCs de diferentes regiões do Brasil e inventariar os flebotomíneos da Gruta da Lancinha, PR, a fim de detectar novos registros e/ou descrever novas espécies nesse ecótopo, trazendo destaque a potenciais áreas de risco para infecção humana por *Leishmania* spp.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PLANO DE TRABALHO:

- Gerar informações que possam subsidiar a conservação do patrimônio espeleológico, assim como estimular a formação de novos taxonomistas;
- Identificar, a nível molecular, as espécies de *Leishmania* circulantes na Gruta da Lancinha, PR, determinando o possível papel do ambiente cavernícola na manutenção dos ciclos ecoepidemiológicos dessa antropozoonose;
- Conhecer localmente os vertebrados utilizados como fonte sanguínea pelas fêmeas de flebotomíneos;
- Avaliar o potencial risco de infecção humana por *Leishmania* spp. em quatro UCs de uso público;
- Subsidiar, a partir das informações taxonômicas, biológicas e de saúde pública a serem obtidas ao longo do estudo, os planos ou propostas de manejo das UCs analisadas;
- Gerar, para cada UC analisada e entorno, mapas de potencialidade de risco para leishmanioses, servindo como modelo piloto a ser aplicado, posteriormente, a nível nacional.

3 - METODOLOGIA:

3.1. UC onde ocorrerá a etapa de campo e critérios para definição e caracterização das demais áreas de análise

3.1.1. UCs a serem utilizadas para análise de dados secundários

Para escolha das UCs, levando em conta os dados secundários publicados e/ou obtidos em coleções científicas, serão respeitados, de forma associada, os seguintes pré-requisitos: 1) Serão analisados inventários de espécies de flebotomíneos realizados em cavernas de três UCs de uso público, sendo que cada UC deverá pertencer a uma região diferente do Brasil; 2) Serão selecionadas pelo menos duas UCs federais onde ocorreu registro(s) de espécie(s) vetora(s) de leishmaniose tegumentar e/ou visceral; 3) UCs com números representativos de visita/ano; 4) Presença ou proposta de plano de manejo e/ou de manejo espeleológico; 5) Presença de desmatamento ou uso recente de ocupação/modificação do solo no entorno da UC.

3.1.2. Monumento Natural da Gruta da Lancinha

A etapa de campo será realizada na Gruta da Lancinha (25° 10' 6" S; 49° 17' 14" O), uma das mais conhecidas cavernas do Paraná, sendo visitada há no mínimo 150 anos, sendo que nos últimos 20, essa ocorre de forma desordenada e sem qualquer tipo de controle no número de visitantes, o que dificulta a criação de estratégias para a utilização sustentável da UC e o desenvolvimento do espeleoturismo regional.

A caverna é aberta a visita e possui três entradas distintas, com três trechos diferentes de trajetos. Situa-se no município de Rio Branco do Sul, inserido na Região Metropolitana de Curitiba/PR e distante cerca de 50 km da capital Curitiba.

Apresenta terrenos de maior declividade e com presença de afloramento de rocha calcária, tendo utilização limitada no passado, o que manteve a vegetação mais conservada. Por outro lado, esta vegetação está sujeita ao efeito de borda e tem sua evolução comprometida, principalmente nos limites com as estradas rurais que cruzam sobre a gruta. Além da vegetação pode ser observado no entorno da gruta da Lancinha atividades de silvicultura, pastagem/agricultura e mineração, das quais as duas primeiras são também observadas no interior da UC. Próximo as moradias, existem áreas utilizadas para pasto e agricultura rudimentar, assim como áreas abandonadas apresentando vegetação em estágio inicial de regeneração, denominada capoeirinha (Grupo de Estudos Espeleológicos-Açungui, comunicação pessoal). Dessa forma, atualmente, a Unidade de Conservação Estadual está classificada como Monumento Natural (MONAT), conforme decreto estadual nº 6.538/2006. A cavidade natural subterrânea é formada principalmente pela dissolução e precipitação do carbonato, sendo que sua galeria principal é formada pelo ribeirão da Lança, que dá nome a gruta e se estende por todo o compartimento principal da caverna. A região onde está localizada a gruta está inserida na Região Fitoecológica da Floresta Ombrófila Mista, conhecida como floresta com araucária, conforme IBGE (2012).

3.2. Levantamentos das notificações de casos de leishmanioses nas UCs e região e das espécies potenciais vetorais de *Leishmania* spp., inventariadas nas cavernas das demais áreas

Para auxiliar na seleção das outras três UCs e cavernas que integrarão o estudo será utilizado o capítulo publicado por Andrade *et al.* (2022) e o artigo de Dutra-Rêgo *et al.* (2022), que compilam informações sobre flebotomíneos registrados em cavernas no Brasil.

Para análise dos dados de literatura, referentes a cada UC, será realizado um corte temporal para sobreposição com os casos de leishmanioses humana, a partir da última publicação ou coleta de fauna flebotomínica cavernícola local. Para tal, serão utilizados artigos científicos publicados e indexados; dissertações e teses; consultas à coleções biológicas; bem como sites como DATASUS e Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério

da Saúde; Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE) e; Secretarias Municipais de Saúde. O período mínimo será de cinco anos e o máximo irá depender da data de publicação do artigo norteador ou de registro da coleta na coleção biológica. Um mapa também será elaborado para o MONAT da Gruta da Lancinha.

3.3. Coleta e acondicionamento de flebotomíneos na Gruta da Lancinha

A metodologia incluirá capturas manuais e/ou a utilização de 13 armadilhas luminosas do tipo CDC e busca ativa, entre agosto de 2023 a julho de 2024. As CDCs serão instaladas por meio de tripés, sem que haja contato com as paredes da caverna e no entorno; as coletas manuais serão realizadas no interior da caverna posicionando microtubos sob os espécimes de flebotomíneos pousados nas superfícies (COSTA *et al.* 2021) ou com o auxílio de um pincel previamente umedecido. As armadilhas luminosas serão instaladas, uma vez por mês durante uma noite, entre 18:00 e 08:00, respeitando o horário de atividade dos flebotomíneos, à 1,5 metro do solo, conforme preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde (MS, 2006). Serão instaladas duas armadilhas em zona afótica, duas em área de penumbra (zona disfótica) e duas na entrada da caverna (zona fótica). As demais serão instaladas, conforme descrito acima, em áreas do entorno respeitando as distâncias de 100, 200 e 400 metros, a princípio, da entrada principal da gruta.

Todas as coletas serão realizadas somente após as autorizações dos órgãos ambientais competentes como o ICMBio, por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), e o Instituto Água e Terra (IAT). Para execução do projeto e divulgação dos resultados esse será cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Para detecção das espécies de *Leishmania* e das fontes alimentares, os flebotomíneos serão acondicionados em álcool 70% e mantidos em freezer -20° C (SALES *et al.* 2020).

A etapa de campo irá contar com o auxílio de acadêmicos vinculados ao Programa de Pós-graduação em Entomologia (PGENTO) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP), ambos da Universidade Federal do Paraná, além do apoio do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV).

Obs: A 1ª etapa de campo (primeira coleta) será antecipada em um mês para ser possível fechar adequadamente a periodicidade mensal das coletas, associado ao fato da aluna ter tempo hábil para a elaboração e submissão do resumo ao XV Seminário PIBIC/ICMBIO, assim como a elaboração do relatório final.

3.4. Etapas de laboratório

Todas as etapas descritas abaixo serão realizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR, cujas metodologias encontram-se padronizadas e onde a candidata a bolsa atualmente realiza estágio de forma voluntária. Importante salientar que a candidata contará com a supervisão de uma doutoranda vinculada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR.

3.4.1. Dissecção e descrição á nível de espécie dos espécimes capturados

Para identificação específica, todos os machos coletados serão clarificados e montados entre lâmina e lamínula, conforme Forattini (1973), no interior de capela de exaustão. Os mesmos serão utilizados para os possíveis novos registros, bem como indicar a ocorrência de novas espécies de flebotomíneos (CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022). Todos os espécimes, machos e fêmeas, serão identificados utilizando a proposta de Galati (2018), seguindo a abreviação dos gêneros proposta por Marcondes (2007) e depositadas na Coleção de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica (DPAT) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (ColPar/DPAT/UFPR).

3.4.2. Dissecção do abdômen das fêmeas e preparo para extração de DNA

Após quatro meses de coletas e já com um conhecimento prévio sobre elas, se dará início à dissecção das fêmeas para as análises moleculares. Em capela de exaustão, as fêmeas destinadas para a detecção de DNA de *Leishmania* ou de fontes alimentares terão os três últimos segmentos do abdômen e a cabeça

retirados, clarificados e montados para identificação a nível específico. As fêmeas serão individualizadas por espécie, codificadas e receberão anotações sobre a presença ou não de sangue no intestino. Aquelas com sangue total ou parcialmente digerido serão direcionadas para as análises de fonte alimentar, e aquelas que não apresentarem resquícios de sangue no intestino, para a detecção de DNA de *Leishmania*.

3.4.3. Detecção de presença de DNA de *Leishmania* spp.

A extração de DNA será realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA[®], Madison, WI, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Após a extração do DNA, para investigar a infecção natural por *Leishmania* spp., as amostras serão submetidas à PCR Multiplex. Para a amplificação da região constante no minicírculo do kDNA do gênero *Leishmania*, que possui 120 pb, será utilizado os oligonucleotídeos A: 5´ (G/C)(G/C)(C/G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC 3´ B: 5´ GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3´ (PASSOS *et al.* 1996). Para o controle endógeno da extração será utilizado o par de oligonucleotídeos 5Llcac: 5´GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3´ e 3Llcac: 5´CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3´ (LINS *et al.* 2002) direcionado ao gene constitutivo “cacophony” que é específico para flebotomíneos, de acordo com PITA-PEREIRA *et al.* (2009). A inclusão deste segundo par de oligonucleotídeos (gene “cacophony”) é para controle do DNA extraído (qualidade, pureza) e da PCR, evitando possíveis falsos negativos, pois as amostras (machos e fêmeas) de flebotomíneos devem amplificar o produto referente a esse alvo. O sequenciamento de DNA, após a purificação, será realizado no Centro de Pesquisas de Célula-Tronco da Universidade de São Paulo. Outros métodos e marcadores moleculares como ITS1 poderão ser utilizados no decorrer no projeto.

3.4.4. Detecção das fontes alimentares

As fêmeas coletadas e destinadas ao estudo de fonte alimentar serão separadas ao apresentarem seu abdômen parcialmente ou completamente repleto de sangue utilizando microscópio estereoscópico. O protocolo a ser utilizado será denominado HotSHOT, testado por Truett *et al.* (2000) e aplicado por Alcaide *et al.* (2009), Martínez-de la Puente *et al.* (2013) e Costa *et al.* (2021) na extração de DNA do sangue presente no abdômen de insetos hematófagos. Serão utilizados oligonucleotídeos desenvolvidos por Alcaide *et al.* (2009) referentes ao gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase I) de vertebrados das classes Amphibia, Reptilia, Aves e Mammalia. O protocolo de nested PCR seguirá Alcaide *et al.* (2009) e modificado por Santos *et al.* (2019), com o objetivo de amplificar o fragmento de COI de ~800 pb. Cada reação irá incluir um controle negativo e um controle positivo estabelecido e utilizado por Santos *et al.* (2019). Os produtos da PCR serão verificados por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras amplificadas com sucesso serão purificadas usando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen[®]) de acordo com as diretrizes do fabricante. As amostras amplificadas serão sequenciadas no Centro de Pesquisas de Célula-Tronco da Universidade de São Paulo.

3.5. Dados climáticos e demais variáveis da etapa de campo

Variáveis abióticas como pluviosidade (mm), umidade relativa (%) e temperatura (°C) da área de estudo serão obtidas, mensalmente, junto ao SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná), utilizando a estação mais próxima localizada no município de Colombo, PR. Os seguintes dados serão analisados: i) abundância (quantidade de espécimes e/ou espécies por mês); ii) periodicidade (distribuição dos espécimes e/ou espécies em relação aos fatores abióticos); iii) sexo (macho ou fêmea); iv) pontos de coleta (zona afótica, penumbra, entrada e área do entorno); v) fêmeas com presença de DNA de *Leishmania*; e vi) fontes alimentares utilizadas.

3.6. Elaboração dos Mapas de potencialidade de risco para leishmanioses

Os mapas do Índice de Densidade Kernel (mapas de calor), para determinação de áreas de risco para leishmanioses nas UCs e entorno, serão elaborados através do software QGis V. 3.22.3-Białowieża, RRID:SCR_018507. Será estabelecido um raio de busca que poderá variar de 5 a 10 km de cada caverna amostrada, para uma série temporal de no mínimo cinco anos, a partir do último registro (coleção biológica ou trabalho) envolvendo flebotomíneos vetores nas

localidades e sobrepondo as notificações de casos de leishmanioses em humanos.

3.7. Cálculos e análises estatísticas

A taxa de infecção natural de flebotomíneos será dada a partir do cálculo do número de *pools* ou número de fêmeas dissecadas positivos/ número total de fêmeas x 100 (VASCONCELOS *et al.* 2019). O índice de constância dos flebotomíneos será calculado a partir da fórmula: $C = P \cdot 100 / N$ (SILVEIRA NETO *et al.* 1976) (P = número de coletas com a espécie estudada e N= número total de coletas efetuadas) classificando as espécies em constantes, acessórias ou acidentais em relação a presença das mesmas nas armadilhas/ pontos de coleta.

Após verificar a normalidade dos dados e para critério de decisão serão aplicados o Teste t de Student (distribuição normal) ou Mann-Whitney (distribuição não-normal), quando comparadas duas variáveis. Acima de duas, após análise da Normalidade, será utilizado o ANOVA ou Kruskal-Wallis para amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para avaliar a interferência dos fatores abióticos na distribuição da fauna e cada uma das espécies mais abundantes, também após análise da Normalidade dos dados, será utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (r_s). Para todas as análises, os dados serão considerados significativos levando em conta o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o BIOESTAT Versão 5.0. As análises estatísticas inicialmente propostas poderão ser revisadas após a coleta dos dados em campo.

4 - RESULTADOS ESPERADOS:

A partir da realização do presente plano de trabalho é esperada a primeira identificação das espécies de flebotomíneos ocorrentes na Gruta da Lancinha e entorno, PR, assim como o conhecimento dos vertebrados ali presentes, que servem de fonte alimentar (potenciais reservatórios de *Leishmania* spp.) para as espécies vetoras ou com potencial de transmissibilidade registrada. Dessa forma, espera-se conseguir avaliar o papel da gruta no ciclo ecoepidemiológico das leishmanioses, considerando que para a região do Vale do Ribeira, que engloba a localidade da etapa de campo aqui proposta, existem vários casos notificados de leishmaniose tegumentar humana (MELO *et al.* 2018). Associado ao fato de não existirem estudos de fauna flebotomínica em cavernas no estado do Paraná, a referida proposta de trabalho permitirá relatar espécies que ainda não são descritas nestes ambientes e contribuirá para o levantamento da biodiversidade flebotomínica no estado, bem como a possível detecção de espécies ainda desconhecidas para a ciência. Após a inclusão no SisGen, os resultados serão divulgados para o público em geral, incluindo órgãos ambientais, bem como gestores das unidades de conservação de uso público com cavernas, que objetivam incluir em seu plano de manejo tal atividade preventiva de monitoramento. Um relatório simplificado será elaborado contendo as cavernas onde foram detectadas a circulação de *Leishmania* spp., espécies vetoras ou em potencial de vetorização, mamíferos reservatórios e mapas de áreas de potencial risco envolvendo municípios relacionados ou próximos as UCs amostradas.

De forma mais específica espera-se que os resultados obtidos possam subsidiar a produção dos seguintes itens:

1. Artigos em revistas científicas indexadas; informes sobre os resultados em revistas de sociedades ou de comunicações científicas (ex. EspeleInfo, Sociedade Brasileira de Espeleologia, etc...);
2. Resumos e apresentações orais em eventos nacionais e internacionais das diferentes áreas do projeto (bioespeleologia, espeleoturismo, parasitologia, entomologia, etologia, medicina e biologia da conservação e saúde pública);
3. Mapas, indicando áreas de potencial risco para leishmanioses, envolvendo cavernas, situadas em UCs de uso público, com presença de espécies de flebotomíneos e circulação de *Leishmania* spp;
4. Matérias e entrevistas para mídia não científica sobre a importância de

conservação do patrimônio espeleológico, das áreas protegidas e entorno, com foco na saúde única.

5. Prestação de serviço de utilidade aos órgãos municipais de saúde e ambientais ligados às atividades de gestão, espeleoturismo e de licenciamento espeleológico.

5 - IMPORTÂNCIA DA EXECUÇÃO DA PESQUISA PARA A CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE:

Considerando o fato das cavidades naturais atuarem como sistemas dinâmicos, armazenarem água, promovendo a recarga dos aquíferos e abrigarem formas de vida com elevado nível de endemismo, e, portanto também de ocorrência fundamental para manutenção do equilíbrio natural destas; com os resultados obtidos será possível justificar, fortalecer e direcionar as diretrizes para a conservação das cavidades naturais brasileiras e suas espécies associadas, garantindo a manutenção desses ambientes em equilíbrio e assegurando uma maior estabilidade local de importantes antropozoonoses, como a leishmaniose. O conhecimento da presença dos vetores e a proximidade com os potenciais reservatórios podem auxiliar, preventivamente, na definição das áreas ou cavernas presentes na UC que não serão abertas à visitação, ou seja, subsidiar ou ratificar os planos de manejo das unidades, a fim de proporcionar um serviço ecossistêmico seguro e de qualidade aos visitantes e espeleólogos. Além disso, os resultados irão auxiliar na identificação de potenciais áreas de risco próximas as UCs, onde poderão ocorrer futuros trabalhos de educação e conscientização ambiental relacionados a saúde única, a partir das secretarias municipais de saúde com o apoio dos órgãos ambientais locais, incluindo o ICMBio.

Os dados a serem obtidos podem reorientar cientificamente a maioria dos estudos bioespeleológicos realizados nos processos de licenciamento ambiental pelas empresas de consultorias, que envolvem a supressão das cavidades naturais e seu entorno, onde as coletas para a verificação da riqueza das espécies são muito restritas temporalmente (apenas uma coleta no período chuvoso e seco), não refletindo a realidade ecossistêmica e biológica das espécies associadas ao ambiente cavernícola, o qual é muitas vezes singular.

Finalmente, o estudo poderá contribuir para o aumento da biodiversidade de flebotomíneos no estado do Paraná; subsidiar a proposta de plano de manejo espeleológico da Gruta da Lancinha, assim como proporcionar condições para a geração de mapas de potencialidade de risco para leishmanioses em cada UC analisada, servindo como modelo piloto a ser aplicado, posteriormente, a nível nacional.

6 - ETAPAS E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO:

Etapa 1 - Revisão Bibliográfica, definição das três UCs a serem incluídas e coletas de dados para confecção do mapas;

Etapa 2 - Coletas de flebotomíneos em campo. Obs: Temos ciência que o ciclo de estágio começará em setembro (de acordo com a tabela abaixo), porém, conforme já informado e justificado na metodologia, a primeira coleta do estudo será antecipada para agosto).

Etapa 3 - Triagem, montagem e identificação das espécies;

Etapa 4 - Elaboração e entrega do relatório parcial ou de acompanhamento;

Etapa 5 - Detecção de DNA de *Leishmania* nas fêmeas;

Etapa 6 - Detecção de fontes alimentares nas fêmeas;

Etapa 7 - Tabulação, tratamento e análises dos dados;

Etapa 8 - Elaboração dos mapas;

Etapa 9 - Elaboração do relatório final;

Etapa 10 - Apresentação em evento científico.

Etapa	Set/23	Out/23	Nov/23	Dez/23	Jan/24	Fev/24	Mar/24	Abr/24	Mai/24	Jun/24	Jul/24	Ago/24
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
4					X	X						
5					X	X	X	X	X	X	X	
6					X	X	X	X	X	X	X	
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
8					X	X	X	X	X			
9										X	X	X
10										X	X	X

Marque com um X o período correspondente a cada uma das etapas. Podem ser acrescentadas novas etapas caso necessário

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALCAIDE M; RICO C; RUIZ S; SORIGUER R; MUÑOZ J; FIGUEROLA J Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS One* 4(9): 7092, 2009.

ALMEIDA P.S; PAULA M.B; BRILHANTE A.F; MEDEIROS-SOUSA A.R; NEITZKE-ABREU H.C; CARRIHO C.J.S; COSTA FILHO P.C; GALATI E.A.B. Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna in a cavern containing cave paintings and its surrounding environment, Central-West Brazil. *Acta Tropica* 199: 105-151, 2019.

ALVAR J; VÉLEZ I.D, BERN C; HERRERO M; DESJEUX P; CANO J; JANNIN J; DEN BOER M; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7(5):e35671, 2012;

ALVES V.R; FREITAS R.A; SANTOS F.L; BARRETT T.V. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3): 353-359, 2011.

ANDRADE A.J; CORDEIRO DP; COSTA J.C.R; GALATI E.A. Diptera: Psychodidae. *In*: ZAMPAULO, R.A. & PROUS X., *Fauna cavernícola do Brasil*, Editora Rupestre, Belo Horizonte, pp.285-303, 2022.

ANDRADE A.J; CHAVES-JÚNIOR S.P.C; MORELLI L.C; SANTOS-CONCEIÇÃO M; SHIMABUKURO PHF. Taxonomia e Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus Impactos na Saúde Pública., p. 137-153. *In*: OLIVEIRA, J. et al. *Atualidades em medicina topical no Brasil: Vetores, Strictu Sensu*, Rio Branco, p. 263, 2020.

BARATA R. A; ANTONINI Y; GONÇALVES M.C; COSTA D.C; EDELBERTO S; DIAS E.S. Phlebotomine sandflies in Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, Minas Gerais state. Brazil. *Neotropical Entomology*, 37 (2): 226-228, 2008.

BARATA R. A; APOLINÁRIO E. C. Sandflies (Diptera: Psychodidae) from caves of the quartzite Espinhaço Range. Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107: 1016-1020, 2012.

BRASIL. Decreto s/n, de 05 de junho de 2017. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional dos

Campos Ferruginosos, localizado nos Municípios de Canaã de Carajás e Parauapebas, Estado do Pará. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/dsn/Dsn14470.htm. Acesso em: 05 jan. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf> Acesso em fev. 2022.

CAMPOS AM; MAIA R.A; CAPUCCI D; PAGLIA A.P; ANDRADE FILHO J.D. Species composition of sand flies (Diptera: Psychodidae) in caves of Quadrilátero Ferrífero, state of Minas Gerais, Brazil. PLoS ONE,15(3): e0220268, 2020.

CARVALHO G. M; BRAZIL R. P; RAMOS M. C; DAS N. F; SERRA E MEIRA P. C. L; ZENÓBIO A.P. L. DE A; BOTELHO H. A; ANDRADE FILHO J. D. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma caverna da província espeleológica de Bambuí, Brasil. PLoS One, 8(10): e77158, 2013.

CARVALHO G.M; BRAZIL R.P; RÊGO F.D; RAMOS M.C; ZENÓBIO A.P; ANDRADE FILHO J.D. Molecular detection of *Leishmania* DNA in wild-caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cave in the state of Minas Gerais, Brazil. Journal of Medical Entomology. 54(1): 196-203, 2017.

CHAVES JUNIOR S.P; SHIMABUKURO P.H.F; ANDRADE A.J. Description of the female and redescription of the male of *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), including the description of four new species of the genus *Sciopemyia* Barretto, 1962 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazil. Zootaxa, v. 5195, p. 301-336, 2022.

COSTA J. C. R; MARCHI G. H; SANTOS C. S; ANDRADE M. C. M; CHAVES JUNIOR S. P; SILVA M. A. N; MELO M. N.; ANDRADE A. J. First molecular evidence of frogs as a food source for sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Brazilian caves. Parasitology Research. 120: 1571-1582, 2021.

FERNANDES W.S.; INFRAN J.O.M.; OLIVEIRA E.F.; CASARIL A.E.; BARRIOS S.P.G.; OLIVEIRA S.L.L.; OLIVEIRA A.G.; Phlebotomine Sandfly (Diptera: Psychodidae) Fauna and The Association Between Climatic Variables and The Abundance of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato in an Intense Transmission Area for Visceral Leishmaniasis in Central Western Brazil. Journal of Medical Entomology. 59(3): 997-1007, 2022.

FORATTINI, O.P. Entomologia Médica. IV.. Psychodidae. Phlebotominae, Leishmaniose e Bartonelose. Edgar Blucher, São Paulo, p.658, 1973.

GALATI E.A.B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 53-176, 2003.

GALATI E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. Vol. I. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018.

GALATI E.A.B; MARASSÁ A.M; GONÇALVES -ANDRADE R.M; CONSALES C.A; BUENO E.M.F. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia. 54(3): 477-487, 2010.

GALATI E.A.B; NUNES V.L; BOGGIANI P.C; DORVAL M.E.C; CRISTALDO G; ROCHA H.C; ISHIRO E.T; GONÇALVES DE ANDRADE R.M; NAUFEL G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 47(2): 283-296, 2003.

IBGE. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

JANSEN D.C; CAVALCANTI L.F; LAMBLÉM H.S. Mapa de potencialidade de ocorrência de cavernas no Brasil, na escala 1:2.500.000. Revista Brasileira de Espeleologia. 2 (1): 42-57, 2012.

LINS R; OLIVEIRA S; SOUZA N.A; QUEIROZ R; JUSTINIANO S; WARD R; KYRIACOU C; PEIXOTO A.A. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. 11: 117-122, 2002.

MARCONDES C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomology News. 118: 351-356, 2007.

MARTÍNEZ-DE LA PUENTE J; RUIZ S; SORIGUER R; FIGUEROLA J. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. Malaria Journal. 12: 109, 2013.

MELO H.A; ROSSONI D.F; TEODORO U. Effect of vegetation on cutaneous Leishmaniasis in Paraná, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo, v.113, p.113-116, 2018.

MENDES C.S; COELHO A.B; FÉRES J.G; SOUZA E.C; CUNHA D.A. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 21(1):263-72, 2016

OGAWA G. M; PEREIRA JÚNIOR A. M; RESADORE F; FERREIRA R. DE G. M; MEDEIROS J. F; CAMARGO L. M. A. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 25(1): 61-68, 2016.

OLIVEIRA-PEREIRA Y.N; REBÊLO J.M.M; MORAES J.L.P; PEREIRA S.R.F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 540-543, 2006.

OSHAGHI M.A; RAVASAN N.M; JAVADIAN E; RASSY Y; SADRAEI J; ENAYAT A.A; VATNADOOSKI H; ZARE Z; ENAMI S.M. Application of predictive degree day model for field development of sandfly vectors of visceral leishmaniasis in northwest of Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*. 46: 247-254, 2009.

PASSOS V.M.A; LASMAR E.B; GONTIJO C.M.F; FERNANDES O; DEGRAVE W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91: 19-20, 1996.

PITA-PEREIRA D; SOUZA G.D; ZWETSCH A; ALVES C.R; BRITTO C; RANGEL E.F. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 80: 593-595, 2009.

QUARESMA P.F; CARVALHO G.M.L; RAMOS M.C.N.F; ANDRADE FILHO J.D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107: 480-485, 2012.

RANGEL E.F; CARVALHO B.M; COSTA S.M; SHAW J.J. Sand fly vectors of American Cutaneous Leishmaniasis. In: RANGEL E.F; SHAW J.J. (Org.). *Sand fly vectors of American Cutaneous Leishmaniasis*. 1ed.Cham, Suíça: Springer, 2018, v., p. 341-380.

READY P.D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*. 58: 227- 250, 2013.

ROCHA L.F; SESSEGOLO G.C; LIMA F.F; LINDOSO G.S; MULLER C.R.C. Conservação e manejo de cavernas no sul do Brasil, uma estratégia viável? In: IV Congresso Brasileiro de Unidades De Conservação, Curitiba. *Anais - Trabalhos Técnicos*. Curitiba: Rede Pró-UC. v. 1. p. 621-630, 2004.

SALES K.G.S; MIRANDA D.E.O; DA SILVA F.J; OTRANTO D; FIGUEREDO L.A; DANTAS-TORRES F. Evaluation of different storage times and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity. *Parasites & Vectors*. 13: 399, 2020.

SALOMÓN O.D; QUINTANA M.G; MASTRÁNGELO A.V; FERNÁNDEZ M.S. Leishmaniasis and climate change-case study: Argentina. *Journal of Tropical Medicine*. 2012:601242, 2012.

SANTOS C.S; PIE MR; DA ROCHA T.C; NAVARRO-SILVA M.A. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *PLoS One*, 14(2): e0212517. 2019

SANTOS TV; RAMOS P.K.S.; SILVA F.M.M; ALVES A.C.O; LIMA L.V.R; CAMPOS M.B; FURTADO R.R; SILVEIRA F.T. Presence of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and natural *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection in the wild rodent, *Proechimys* sp. (Rodentia: Echimyidae), in the 'Serra dos Carajás', southern of Pará State, Brazil. In: 6th World Congress on Leishmaniasis, Toledo. Abstract Book, 2017.

SHARRATT NJ; PICKER MD; SAMWAYS MJ. The invertebrate fauna of the sandstone caves of the Cape Peninsula (South Africa): patterns of endemism and conservation priorities. *Biodiversity & Conservation*, v. 9, n. 1, p. 107-143, 2000.

SHIMABUKURO P.H; ANDRADE A.J; GALATI E.A.B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution *Zookeys*, 660: 67-106, 2017.

SILLER JUNIOR A.; GARCIA B.A; KIPP, E.J; LEE M; TYRING S. Cutaneous leishmaniasis in a recreational cave diver after travel to México. *Cureus*. v. 13, n. 8. e16896.

SOUZA-SILVA M; MARTINS R.P; FERREIRA R.L. Cave lithology determining the structure of the invertebrate communities in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Biodiversity and Conservation*, 20, 1713-1729. 2011

TRUETT G.E; HEEGER P; MYNATT R.L; TRUETT A.A; WALKER J.A & WARMAN M.L Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*. 9(1): 52- 54, 2000.



Documento assinado eletronicamente por **Julio Cesar Rocha Costa, Analista Ambiental**, em 14/07/2023, às 20:05, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **15327641** e o código CRC **E5743EAA**.

