

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo de flebotomíneos em Lassance, Minas Gerais, Brasil: visão epidemiológica, ecológica e perspectivas para o complexo *Lutzomyia longipalpis*

Por

Gabriel Barbosa Tonelli

Belo Horizonte

2021

TESE

DCS – IRR

G. B. TONELLI

2021

GABRIEL BARBOSA TONELLI

Estudo de flebotomíneos em Lassance, Minas Gerais, Brasil: visão epidemiológica, ecológica e perspectivas para o complexo *Lutzomyia longipalpis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração: Transmissores de patógeno.

Orientador: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Coorientadora: Dra. Carina Margonari de Souza

Belo Horizonte

2021

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

T612e
2021

Tonelli, Gabriel Barbosa.

Estudo de flebotomíneos em Lassance, Minas Gerais, Brasil: visão epidemiológica, ecológica e perspectivas para o complexo *Lutzomyia longipalpis* / Gabriel Barbosa Tonelli – Belo Horizonte, 2021.

XVI, 108 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88 – 106

Tese (Doutorado) - Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Transmissores de Patógeno

1. Leishmaniose 2. Flebotomíneos 3. Ecologia I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Souza, Carina Margonari (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Gabriel Barbosa Tonelli

Estudo de flebotomíneos em Lassance, Minas Gerais, Brasil: visão epidemiológica, ecológica e perspectivas para o complexo *Lutzomyia longipalpis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração: Transmissores de patógeno.

Banca examinadora:

Dr. José Dilermando Andrade Filho (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dra. Carina Margonari de Souza (IRR/FIOCRUZ) coorientadora

Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati (FSP/USP) Titular

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular

Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira (UFMS) Titular

Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Felipe Dutra Rego (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 07/06/2021.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, confiança e fé.

Ao meu orientador, José Dilermando Andrade Filho, vulgo Leco, pelos ensinamentos, convivência, amizade e acreditar em minha capacidade para superar os obstáculos.

À minha coorientadora Carina Margonari, Margô, pela, amizade, determinação e ensinamentos científicos e da vida.

À Carol Cunha pela amizade, profissionalismo e persistência ao me ajudar a tentar solucionar novos problemas e superar os mesmos.

À todos os motoristas do IRR Fiocruz Minas por seu trabalho prestado, colaboração, confiança e amizade.

Ao professor Gordon Hamilton por aceitar me supervisionar em minha oportunidade de PhD Sanduíche na Lancaster University, pelos ensinamentos e por compartilhar comigo seu tempo, sua sabedoria e experiência.

À todos os pesquisadores, técnicos e alunos do Grupo de Estudo em Leishmanioses do Instituto René Rachou, a companhia e colaboração de vocês foi e é muito importante para minha formação.

Ao Felipe Rego e Gustavo Mayr, pela amizade que perdura há anos. Muito aprendi e muito aprenderei com vocês.

À equipe técnica do departamento de Ciências Biomédicas e da Vida, da Universidade de Lancaster, em especial à técnica Elizabeth e aos alunos, pela recepção, amizade, acolhimento e ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao órgão de fomento, FAPEMIG Pelo trabalho árduo e pela bolsa de Doutorado em tempos difíceis.

À prefeitura e a secretaria de saúde de Lassance – MG pelos auxílios para com o desenvolver do projeto.

À população de Lassance – MG envolvida no trabalho por abrirem suas portas, literalmente, para o desenvolvimento da pesquisa, por sua confiança e afeto.

As alunas, Victoria Laporte, Marina Prado, Gabriela Theobaldo, por me ensinar tanto enquanto eu as coorientava.

Ao Dr. Emilio de Castro Miguel e ao Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro pela recepção e colaboração na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

E, por fim, a todas as pessoas que comigo tiveram contato ao longo destes anos. Com certeza, por mais que por minutos, o período que dividimos contribuiu muito para meu crescimento.

Obrigado.

Resumo

As leishmanioses são doenças parasitárias de origem zoonótica transmitidas por insetos flebotomíneos. A distribuição destas doenças está diretamente relacionada à presença, expansão e dispersão dos flebotomíneos. O presente estudo teve como objetivo estudar a fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance, detectar DNA de *Leishmania* nas fêmeas coletas, aferir sua capacidade de voo e estudar os aspectos taxonômicos relacionados à espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal espécie envolvida na veiculação da *Leishmania infantum* no Brasil. Foram realizadas coletas com armadilhas luminosas do tipo HP na área urbana do município de Lassance - MG entre os meses de Maio de 2018 e Abril de 2019. Nas fêmeas coletadas foi realizada análise molecular para determinar a presença de DNA de *Leishmania* através da técnica de PCR, dirigida ao alvo ITS1. A identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na detecção foi realizada através da técnica de PCR-RFLP *HaeIII*. Para estudo da capacidade de voo foram instaladas armadilhas na região central do rio das Velhas, a 80 metros equidistantes entre si e entre cada margem. Para o estudo taxonômico, flebotomíneos machos do complexo *Lu. longipalpis*, de 4 localidades (Campo Grande, Jacobina, Sobral e Lassance) foram utilizados para análise de ultramicroscópica de estruturas cuticulares internas que podem estar associadas à produção de feromônio. Um total de 1.611 espécimes de flebotomíneos foi capturado na área urbana de Lassance, com predominância das espécies *Lu. longipalpis* e *Nyssomyia intermedia*. DNA de *Le. infantum* em *Lu. longipalpis* foi detectado na área urbana de Lassance. No estudo da capacidade de voo, foi capturado um total de 804 espécimes de flebotomíneos sendo 798 indivíduos nas margens e 6 indivíduos na região central do rio, comprovando que os flebotomíneos podem voar de forma ininterrupta por pelo menos 80 metros. As análises de microscopia de varredura revelaram estruturas internas responsáveis pela liberação de feromônio no complexo *Lu. longipalpis*, sendo denominadas "manifold". Além disso, foi possível observar diferenças morfológicas nesta estrutura, entre as populações deste complexo de espécies que produzem diferentes quimiotipos. Os resultados encontrados aqui auxiliarão nas medidas de controle vetorial e compreensão da epidemiologia das leishmanioses no município de Lassance além de fornecer dados sobre a capacidade de voo dos flebotomíneos e

melhor entendimento sobre a taxonomia do complexo *Lu. longipalpis* no que tange as estruturas relacionadas a liberação de feromônio.

Palavras-chave: Leishmanioses; flebotomíneos; ecologia; taxonomia; epidemiologia.

Abstract

Leishmaniases are parasitic diseases of zoonotic origin transmitted by sand flies. The distribution of these diseases is directly related to the presence, expansion and dispersion of sand flies. This study aimed to study the sand fly fauna in the urban area of Lassance, detect *Leishmania* DNA in collected females, assess their flight capacity and study the taxonomic aspects related to the species *Lutzomyia longipalpis*, the main species involved in the dissemination of *Leishmania infantum* in the Brazil. Collections were carried out with HP type light traps in the urban area of the municipality of Lassance - MG between the months of May 2018 and April 2019. In the collected females a molecular analysis was performed to determine the presence of *Leishmania* DNA through the PCR technique, directed at the ITS1 target. The identification of the *Leishmania* species involved in the detection was performed using the PCR-RFLP *HaeIII* technique. To study the flight capacity, traps were installed in the central region of the Velhas' river, 80 meters equidistant from each other and between each bank. For the taxonomic study, male sand flies from the *Lu. longipalpis* complex, from 4 locations (Campo Grande, Jacobina, Sobral and Lassance) were used for ultramicroscopic analysis of internal cuticular structures that may be associated with pheromone production. A total of 1,611 sandfly specimens were captured in the urban area of Lassance, with a predominance of the *Lu. longipalpis* species and *Nyssomyia intermedia*. DNA of *Le. infantum* in *Lu. longipalpis* was detected in the urban area of Lassance. In the study of flight capacity, a total of 804 specimens of sand flies were captured, 798 individuals on the banks and 6 individuals in the central region of the river, proving that sand flies can fly uninterruptedly for at least 80 meters. Scanning microscopy analyzes revealed internal structures responsible for pheromone release in the *Lu. longipalpis* complex, being called "manifold". Furthermore, it was possible to observe morphological differences in this structure among populations of this complex of species that produce different chemotypes. The results found here will help to measure vector control and understand the epidemiology of leishmaniasis in the municipality of Lassance, in addition to providing data on the flight capacity of sand flies and a better understanding of the taxonomy of the *Lu. longipalpis* complex regarding structures related to pheromone release.

Keywords: Leishmaniases; sand flies; ecology; taxonomy; epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Paciente em estado avançado de leishmaniose visceral. As marcas no abdômen indicam a hepato e esplenomegalia.....	18
Figura 2	Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no mundo.....	19
Figura 3	Lesão ulcerada típica da LT com formato arredondado, bordas elevadas e fundo granuloso.....	21
Figura 4	Manifestação da LT de forma disseminada com várias lesões infiltrativas e pequenas úlceras na face posterior do tronco.....	21
Figura 5	Forma cutânea difusa da LT apresentando lesões em placa infiltrada e tubérculos no paciente, polimorfismo lesional.....	22
Figura 6	Forma mucosa da LT.....	22
Figura 7	Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo.....	23
Figura 8	Flebotomíneos adultos machos e fêmeas em uma gaiola.....	26
Figura 9	Localização do município de Lassance no Estado de Minas Gerais, Brasil.....	32
Figura 10	Imagem aérea de Lassance feita por drone.....	33
Figura 11	Pontos turísticos localizados em Lassance – MG.....	33
Figura 12	Distribuição das armadilhas para coleta de flebotomíneos no Município de Lassance, MG.....	35
Figura 13	Ponto amostral Casa 01.....	37
Figura 14	Armadilha instalada no ponto amostral Casa 2 em pequeno terreiro a frente da residência.....	38
Figura 15	Ponto amostral Casa 03.....	39
Figura 16	Ponto amostral Casa 04.....	40
Figura 17	Ponto amostral Casa 05.....	41
Figura 18	Ponto amostral Casa 06.....	42
Figura 19	Ponto amostral Casa 07.....	43
Figura 20	Ponto amostral Casa 08.....	44
Figura 21	Hipóteses a serem testadas no estudo de capacidade de voo dos flebotomíneos.....	46
Figura 22	Suporte desenvolvido para realizar estudo de capacidade de voo dos flebotomíneos utilizando meio aquático como barreira.....	47

Figura 23	Região utilizada para estudo da capacidade de voo e pontos de coleta ao longo do Rio das Velhas, em Lassance.....	48
Figura 24	Armadilha instalada em região central do Rio das Velhas em Lassance, MG.....	49
Figura 25	Vista panorâmica do rancho Tia Maria na margem 2 do rio das Velhas em Lassance, MG.....	50
Figura 26	Delineamento da análise da capacidade de voo dos flebotomíneos por captura, marcação, soltura e recaptura.....	51
Figura 27	Delineamento da metodologia para remoção das partes moles do interior do abdômen do flebotomíneo.....	53
Figura 28	NMDS da ocorrência e abundância de flebotomíneos em relação aos pontos amostrais na área urbana de Lassance, MG.....	59
Figura 29	Eletroforese em gel de agarose 4% da PCR RLFP das amostras organizadas em Pool.....	62
Figura 30	Áreas de risco de transmissão de leishmanioses na área urbana de Lassance, MG, de acordo com frequência das espécies de flebotomíneo <i>Lu. longipalpis</i> e <i>Ny. intermedia</i>	63
Figura 31	MEV do interior dos seguimentos abdominais de <i>Lu. longipalpis</i> de Campo Grande demonstrando distribuição das estruturas nas áreas correspondentes às manchas vistas, normalmente, do lado externo do inseto.....	68
Figura 32	Desenho esquemático dos componentes do aparato secretor de <i>Lutzomyia longipalpis</i> de Campo Grande, MG.....	69
Figura 33	Aparatos secretores observados na cutícula interna abdominal de 3 membros do complexo <i>Lu. longipalpis</i>	70
Figura 34	Dimensão dos componentes do aparato secretor analisado em 3 membros do complexo <i>Lu. longipalpis</i>	72
Figura 35	Desenho ilustrativo das diferenças morfológicas observadas no formato e tamanho do manifold nos três membros do complexo <i>Lu. longipalpis</i> de Campo Grande, Sobral e Jacobina.....	73
Figura 36	MEV do interior dos seguimentos abdominais de <i>Lu. longipalpis</i> de Lassance, MG demonstrando distribuição das estruturas na área correspondente à mancha observada do lado externo do	74

	inseto.....	
Figura 37	Análise de ultraestrutura por MEV (Quanta 450 FEG – FEI) em indivíduos do complexo <i>Lu. longipalpis</i> (1S) da população de Lassance, MG.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Proporção amostral de flebotomíneos machos e fêmeas capturados durante o estudo da fauna na área urbana do município de Lassance, MG, em relação ao número amostrado de indivíduos do complexo <i>Lu. longipalpis</i>	56
Gráfico 2	Distribuição mensal da fauna flebotomínica durante o período amostral no município de Lassance, MG.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos pontos amostrais do estudo da fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance, MG.....	34
Tabela 2	Local de coleta original e tipo de feromônio dos membros do complexo de espécies de <i>Lu. longipalpis</i> mantidos em colônia na Universidade de Lancaster - UK utilizados no estudo.....	52
Tabela 3	Flebotomíneos coletados no estudo da fauna no período de maio de 2018 a abril de 2019 na área urbana de Lassance – MG.....	57
Tabela 4	Detecção de DNA de Leishmania por PCR ITS1 e caracterização através de restrição de fragmento pela enzima HaeIII.....	61
Tabela 5	Comportamento do vento, temperatura e fase lunar durante a análise de capacidade de voo dos flebotomíneos em Lassance – MG nos meses de maio de 2017, janeiro de 2018 e julho de 2018.....	64
Tabela 6	Flebotomíneos coletados na análise da capacidade de voo no rio das Velhas, Lassance – MG.....	65
Tabela 7	Relação de flebotomíneos capturados, marcados, soltos e recapturados durante a análise de capacidade de voo no período de agosto e dezembro de 2020 e fevereiro e março de 2021.....	66
Tabela 8	Flebotomíneos capturados na tentativa de recaptura com armadilha luminosa HP em agosto e dezembro de 2020 e fevereiro e março de 2021 em relação aos locais de captura: Galinheiro, Margem esquerda e por armadilha shannon na área de estudo localizada em Lassance, MG..	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3MaH	(1S,3S,7R)-3-methyl- α -himachalene
9MGB	(S)-9-methylgermacrene-B
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GEL	Grupo de Estudos em Leishmanioses
GPS	Global Positioning System
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMDS	Hexamethildizilazane
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRR	Instituto René Rachou
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
Km	Quilômetros
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Le</i>	<i>Leishmania</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
Lu	Lutzomyia
LV	Leishmaniose visceral

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da saúde
Ny	Nyssomyia
OMS	Organização mundial de saúde
Pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PrInt CAPES	Programa de Internacionalização da CAPES
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
sp	Espécie
SOB-1	Sobralene-1
SOB-2	Sobralene-2
UV	Ultravioleta
UK	United Kingdom (Reino Unido)
V.	<i>Viannia</i>
WHO	World Health Organization
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Leishmanioses.....	17
1.2	Flebotomíneos.....	25
1.2.1	O complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	26
1.2.2	Comportamento de voo e dispersão de flebotomíneos.....	28
1.3	Flebotomíneos de Lassance e a presença do complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	29
2	OBJETIVO GERAL.....	31
2.1	Objetivos específicos.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Área de estudo.....	32
3.2	Estudo da fauna dos flebotomíneos na área urbana do município de Lassance.....	34
3.2.1	Delineamento das capturas de flebotomíneos.....	34
3.2.2	Análises estatísticas.....	45
3.2.3	Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> nos flebotomíneos coletados e calculo da taxa de infecção.....	45
3.2.4	Determinação de áreas de risco.....	46
3.3	Estudo da capacidade de voo dos flebotomíneos.....	46
3.3.1	Análise da capacidade de voo por interceptação em meio aquático.....	46
3.3.2	Análise de capacidade de voo por captura, marcação e recaptura.....	49
3.4	Estudo morfológico das glândulas de feromônio do complexo <i>Lu. longipalpis</i>	51
3.4.1	Delineamento do estudo.....	52
3.4.2	Dissecção.....	53

3.4.3	Limpeza e desidratação do abdômen de flebotomíneo.....	53
3.4.4	Análise de ultraestrutura.....	54
3.4.5	Medidas das estruturas da glândula de feromônio.....	54
3.5	Licenças e aspectos éticos.....	55
4	RESULTADOS.....	56
4.1	A fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance.....	56
4.2	Detecção molecular de <i>Leishmania</i> sp e determinação de área de risco.....	60
4.3	Capacidade de voo dos flebotomíneos.....	64
4.4	Estudo da morfologia da glândula de feromônio do complexo <i>Lu. longipalpis</i>	67
5	DISCUSSÃO.....	76
5.1	Estudo da fauna de flebotomíneos no município de Lassance, MG.....	76
5.2	Estudo da capacidade de voo dos flebotomíneos.....	80
5.3	Estudo morfológico da glândula de feromônio do complexo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	83
6	CONCLUSÕES.....	87
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8	ANEXO.....	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas de origem silvestre distribuídas também presentes em meios urbanos e periurbanos colocando em risco a saúde humana e animal. Estas parasitoses são transmitidas durante o repasto sanguíneo das fêmeas de várias espécies de flebotomíneos (FORATTINI *et al.*, 1976; SHERLOCK, 2003) e são bastante complexas em relação a sua ecologia e epidemiologia, englobando cerca de 21 espécies de parasitos (protozoários responsáveis pelas doenças - Leishmanioses), além de apresentar diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem, que atuam como hospedeiros e/ou reservatórios (ROQUE & JANSEN, 2014).

As leishmanioses estão amplamente distribuídas nas diferentes regiões do planeta, ao longo de toda faixa tropical, incluindo em nosso território nacional principalmente em regiões de precárias de condições sanitárias e estão diretamente relacionadas à presença de seus reservatórios vertebrados e vetores invertebrados. Assim como a doença, os flebotomíneos são encontrados em todas as regiões do Brasil e apresentam adaptação aos diferentes ambientes encontrados.

A enfermidade possui duas principais formas de manifestação, sendo elas: forma cutânea que é caracterizada por infecção por *Leishmania* sp. que acomete a pele, mucosas e semi mucosas, distinguindo-se em formas cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa, mucosa ou muco cutânea, variando de acordo com a espécie do agente etiológico, vetor e resposta imune do hospedeiro humano. E, a forma visceral que envolve órgãos internos. Ainda, existem complicações desta patogenia com outras doenças, uma vez que coexistem em mesmo local e hospedeiros se expõem à risco de infecções mistas. Um caso clássico é em relação à coinfeção de *Leishmania* sp. e HIV onde no paciente imunossuprimido as formas das leishmanioses se manifestam mais gravemente tornando um quadro clínico mais delicado e exigindo maiores atenções para com o tratamento (COPELAND & ARONSON, 2015; LINDOSO *et al.*, 2016).

Em relação à leishmaniose visceral (LV), esta é uma parasitose caracterizada por complicações crônicas, podendo no homem apresentar palidez das membranas mucosas, linfadenopatia e, ainda, acomete órgãos como o fígado e

baço, causando megalia nestes (**Figura 1**) (WHO, 2010). Esta forma da doença é causada por duas espécies do complexo *donovani* sendo a espécie *Leshmania donovani* responsável pela enfermidade em Bangladesh, China Oriental, Índia, Nepal, Paquistão e Sudão. Já a espécie *Le. infantum* é distribuída também no Velho Mundo (regiões sudoeste e central da Ásia, nordeste da China, norte africano e na Europa mediterrânea) e no Novo Mundo, nas américas, onde o parasito é amplamente distribuído e pode ter mortalidade alta nos infectados, alcançando 90%, dos casos não tratados (KILLICK-KENDRICK, 1985; CAMPINO *et al.*, 2006; DANTAS-TORRES, 2006; MAIA-ELKHOORY *et al.*, 2008; SEREDI *et al.*, 2008ab).

Figura 1: Paciente em estado avançado de leishmaniose visceral. As marcas no abdômen indicam a hepato e esplenomegalia.

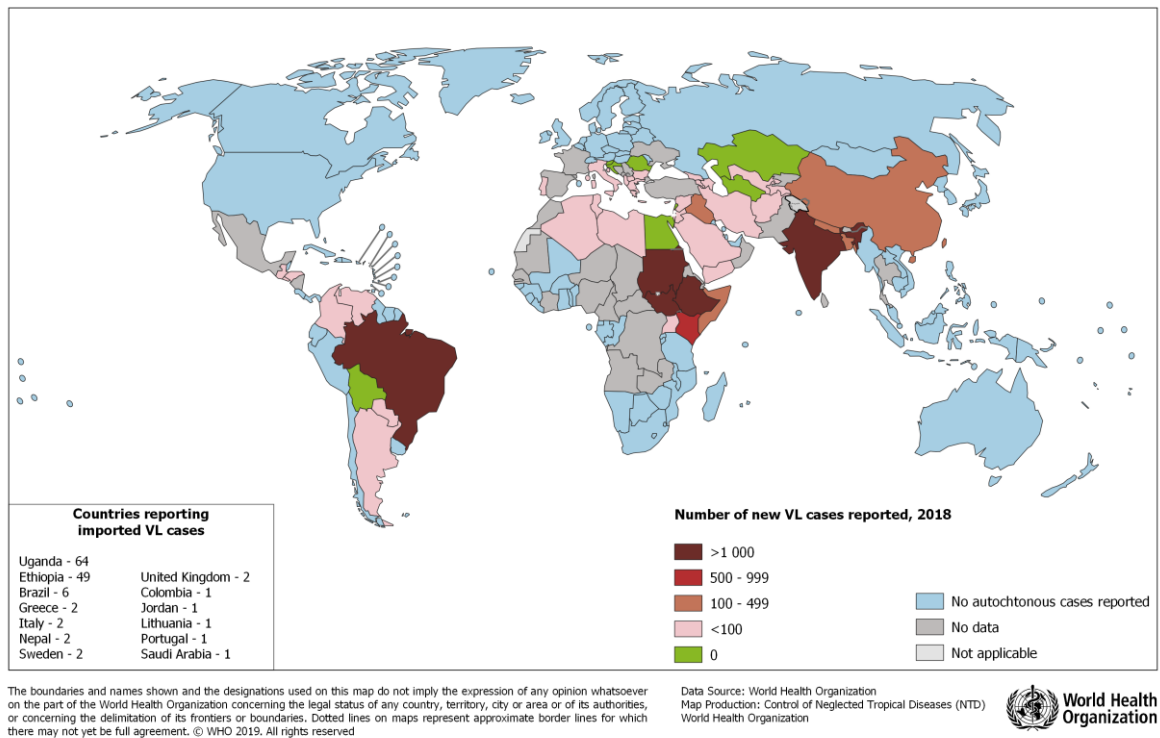


Fonte: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Ministério da Saúde, 2014.

A LV é a forma clínica mais grave da leishmaniose com mais de um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas e em risco de se infectar. Estima-se 30.000 novos casos anuais (WHO, 2021). Sua distribuição está acondicionada a

regiões de clima tropical, subtropical e temperado (DEANE & DEANE, 1962) e têm 90% dos casos notificados no Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (**Figura 2**) (WHO, 2021). O primeiro relato de caso de LV no território nacional foi realizado em 1913, em um paciente de Porto Esperança, Mato Grosso do Sul (MIGONE, 1913). Acredita-se que esta parasitose teve sua abrangência ao longo do território brasileiro a partir das alterações antrópicas no ambiente e intensa e rápida migração da população rural para zonas periféricas das cidades com inadequadas infraestruturas sanitárias. Nestes ambientes, animais silvestres juntamente com animais domésticos, principalmente o cão, desempenham papel de reservatórios (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008) acarretando na urbanização da doença (ALENCAR, 1983, RANGEL & VILELA, 2008).

Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no mundo.



Fonte: WHO, 2021

A principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão da LV nas Américas é *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912). Esta espécie é encontrada abundantemente em áreas domiciliares, peridomiciliares e ambientes rurais estando perfeitamente adaptada ao ambiente antropizado, o que permite a manutenção do

ciclo da doença em áreas rurais e urbanas (RANGEL & VILELA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012; RÊGO *et al.*, 2014).

A *Le. infantum* já foi encontrada em diversos mamíferos que atuam como hospedeiros/reservatórios, principalmente canídeos, roedores e marsupiais (DEANE & DEANE, 1954; LAINSON *et al.*, 1979; GRIMALDI *et al.*, 1989; SHERLOCK *et al.*, 1984; LAINSON & SHAW, 1987; ASHFORD, 1996; HOTEZ, 2017).

A relação entre a presença de cães, flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* e casos de LV já é bem estabelecida e diversos são os métodos de prevenção adotados pela população a fim de evitar a propagação desta doença (COSTA, 2008; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2010; BRAZIL, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SALOMÓN *et al.*, 2015), entretanto, nenhum deles têm se mostrado eficaz.

Já a outra forma da doença, a leishmaniose tegumentar (LT), acomete o tecido cutâneo do hospedeiro. É causada por parasitos dos subgêneros *Mundinia* no velho mundo e *Leishmania* no velho e novo mundo e *Viannia* no novo mundo (HIDE *et al.*, 2007; REITHINGER, *et al.*, 2007; SERENO, 2019).

A LT é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulceradas no local da picada do vetor (leishmaniose cutânea localizada – LCL) e tem tendência à cura espontânea, como revisado por Cota *et al.*, (2016), de 6% (**Figura 3**). Ainda quanto ao comprometimento do tecido cutâneo, a LT é caracterizada por forma cutânea disseminada, que é uma forma menos comum e que se manifesta pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares acometendo várias regiões do corpo do paciente e as espécies do parasito envolvidas nesta manifestação são *Le. (L.) amazonensis* e *Le. (V.) braziliensis* (**Figura 4**). A LT pode também se manifestar na forma mucocutânea que, clinicamente, se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Os agentes etiológicos desta forma são parasitos da espécie *Le. (V.) braziliensis*, entretanto com casos atribuídos também a parasitos da espécie *Le. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Outra manifestação da forma cutânea é a forma cutânea difusa que, no Brasil, é causada pela *Le. (L.) amazonensis*. Esta manifestação é caracterizada por lesões em forma de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas e não apresenta resposta ao tratamento (**Figura 5**). Diferentemente da forma cutânea, a inflamação do tecido mucoso comprometendo o tecido conjuntivo do paciente (leishmaniose mucosa – LM) é considerada uma forma secundária da LT que afeta, na maior parte das vezes, as mucosas das vias aéreas superiores e que em alguns casos pode

comprometer as conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais (**Figura 6**) (REITHINGER *et al.*, 2007; MS, 2017).

Figura 3: Lesão ulcerada típica da LT com formato arredondado, bordas elevadas e fundo granuloso.



Fonte: MS, 2017

Figura 4: Manifestação da LT de forma disseminada com várias lesões infiltrativas e pequenas úlceras na face posterior do tronco.



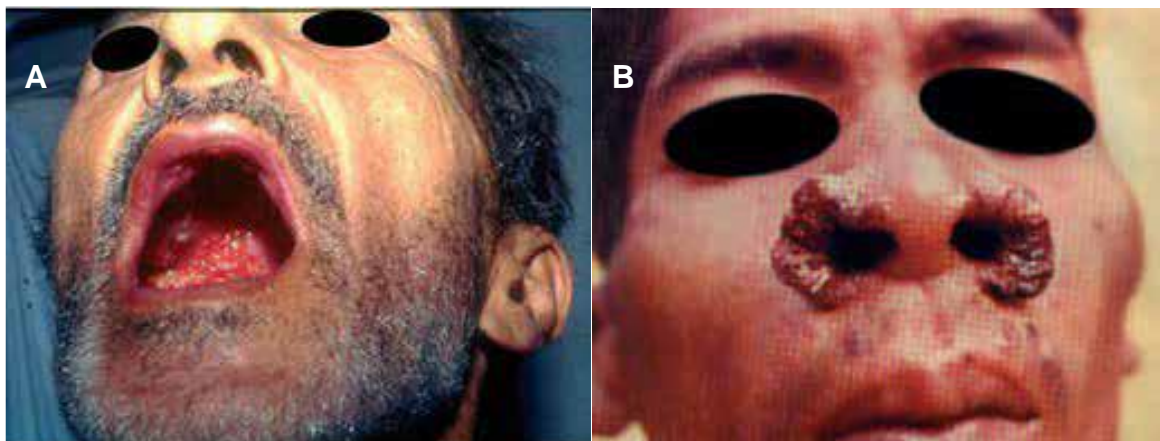
Fonte: MS, 2017.

Figura 5: Forma cutânea difusa da LT apresentando lesões em placa infiltrada e tubérculos no paciente, polimorfismo lesional.



Fonte: MS, 2017.

Figura 6: Forma mucosa da LT. **A** – Forma mucosa indeterminada com lesões ulceradas no palato mole e lábio superior. **B** – Lesão de mucosa nasal com ulceração nas asas nasais e lesões nódulo infiltrativas.

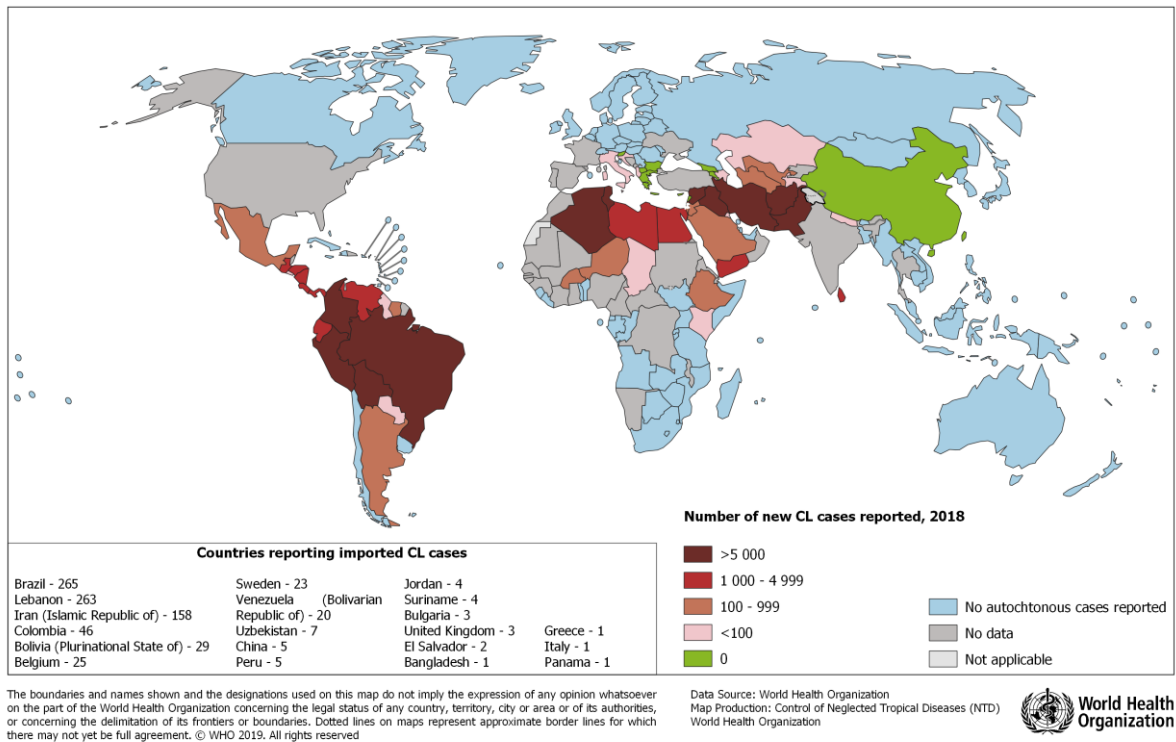


Fonte: MS, 2017.

Os casos de LT estão amplamente distribuídos na faixa tropical, estimados em 1,5 milhão de novos casos por ano e, entre os 10 países do mundo com maior incidência de LT, quatro estão nas Américas sendo eles Brasil, Colômbia, Nicarágua

e Peru. A região das Américas apresenta média de 55 mil casos de leishmaniose cutânea e mucosa. A LT é endêmica em 18 dos 20 países onde fora registrada, sendo eles: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, Guiana (reportando diretamente à França), Honduras, Nicarágua, México, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (**Figura 7**) (WHO, 2021).

Figura 7: Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo.



Fonte: WHO, 2021

Considerada uma parasitose de origem silvestre e que se encontra em constante expansão geográfica, a importância médica da LT nas Américas (LTA) está diretamente associada a pessoas que frequentam áreas de risco como zonas rurais e regiões periurbanas. Ainda, a expansão geográfica desta doença está relacionada às atividades de desmatamento e mudanças no comportamento populacional que geram alterações ambientais permitindo assim, maior contato entre vetores e reservatórios (GONTIJO *et al.*, 2002; TRAVI *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2008; MS, 2017; TONELLI *et al.*, 2017ab).

A LTA apresenta uma grande diversidade de reservatórios destacando-se algumas espécies de animais silvestres das ordens Rodentia, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Chiroptera (ASHFORD, 1996; GONTIJO E CARVALHO, 2003; ROQUE & JANSEN, 2014). Em um estudo realizado por Truppel e colaboradores (2014), foi detectada infecção por *Le. braziliensis*, através de métodos moleculares e sorológicos, em cavalo e em mula no Sul do Brasil sugerindo possível papel destes animais como mantenedores do parasito no ambiente.

O comportamento sinantrópico de alguns animais como ratos e gambás pode ser juntamente com o estabelecimento dos vetores, o fator que desencadeie a urbanização do ciclo da LTA colocando em risco a saúde humana o que tornam estes animais alvo de estudos para controle dos reservatórios das leishmanioses (BRANDÃO-FILHO, *et al.*, 2003). Alguns mamíferos silvestres já foram mencionados por serem reservatórios ou hospedeiros acidentais de *Leishmania* spp. e, ainda, serem encontrados em locais próximos de áreas urbanizadas como as espécies da ordem Rodentia: *Meriones shawi*, *Rhombomys opimus*, *Rattus rattus*, *Oryzomys capito*, *Akodon* sp. e *Cuniculus paca*; Marsupialia: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris* e *Phinlander opossum*; Xenarthra: *Tamandua tetradactyla*; Carnivora: *Cerdocyon thous* e *Felis catus*; Perissodactyla: *Equus asinus*, *Equus caballus* (ASHFORD, 1996; GRAMICCIA & GRADONI, 2005; QUARESMA *et al.*, 2011; QUARESMA *et al.* 2012; ROQUE & JANSEN, 2014; MS, 2017 PEREIRA *et al.*, 2017; TONELLI *et al.*, 2017b).

Em relação aos vetores de parasitos associados à LTA, várias espécies de flebotomíneos são associadas à veiculação do parasito causador da forma cutânea no Brasil. *Nyssomyia intermedia*, envolvida na transmissão do parasito *Le. braziliensis*, tem hábito alimentar em animais silvestres e domésticos e, ainda, apresenta comportamento antropofílico, enfatizando sua importância médica (DE SOUZA *et al.*, 2006; MARGONARI *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2010). Outra espécie de flebotomíneo de grande importância epidemiológica na transmissão do parasito é *Ny. whitmani*. A espécie apresenta ampla distribuição geográfica sendo observada em quase todo o território brasileiro (RANGEL & LAINSON, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013).

1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae e 530 espécies são encontradas nas Américas atualmente (SHIMABUKURO *et al.*, 2017). Estes artrópodes são dípteros de pequeno porte medindo de dois a quatro milímetros e, como todos os dípteros, são insetos holometábolos tendo em seu ciclo vital as fases de ovo, larva, que compreende quatro estádios, pupa e, finalmente, adultos.

As formas imaturas da evolução dos flebotomíneos se diferenciam de outros insetos por se desenvolver em terreno rico de matéria orgânica, não dependendo diretamente da água para que ocorra a eclosão. A forma adulta tem como características o voo saltado e apresentam corcunda dorsal e asas com formato oval lanceolado (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017) **(Figura 8)**. Distinguem-se, entretanto, dos demais insetos dessa família, por apresentarem corpo mais delgado, pernas mais longas e delgadas, além de suas fêmeas, com exceção daquelas com comportamento partenogênico e autogênico (ALVES *et al.*, 2008), necessitarem de sangue para a maturação de ovos, apresentando hábito alimentar telmatofágico (insetos que utilizam suas peças bucais para provocarem micro hemorragias subcutâneas, nas quais eles se alimentam sorvendo o sangue), razão pela qual foram agregados pelos taxonomistas na família Phlebotomidae (BRAZIL & GOMES BRAZIL, 2003).

Os flebotomíneos são hospedeiros invertebrados das espécies do gênero *Leishmania* (Ross 1903), que causam as leishmanioses em mamíferos, incluindo humanos. Nas Américas existem 40 espécies de flebotomíneos que estão envolvidas na transmissão do parasito *Leishmania* sp. (BRAZIL *et al.*, 2015).

Os flebotomíneos distribuem-se por quase todas as regiões faunísticas do mundo, representados por diversas espécies. São mais abundantes na Região Neotropical, com maior número de espécies e densidade que flutua de acordo com a estação climática (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Os métodos de localização geográfica de precisão utilizam atualmente GPS e as imagens de satélites, para verificação da distribuição e modelagem de nicho ecológico das espécies de flebotomíneos importantes como vetores (PETERSON & SHAW, 2003).

Figura 8: Flebotomíneos adultos machos e fêmeas em uma gaiola.



Fonte: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=3177&sid=32&tpl=printprinte>.

1.2.1 O complexo *Lutzomyia longipalpis*.

Dentre as espécies de flebotomíneos destaca-se *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da *Le. infantum*, agente etiológico da LV, e espécie altamente adaptada a áreas urbanas (BRAZIL, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos morfológicos foram pioneiros na caracterização desta espécie como um complexo de espécies ao observar polimorfismo no abdômen de machos, que podiam se apresentar com uma mancha no 3º tergito ou com duas manchas nos 3º e 4º tergitos (MANGABEIRA, 1969). Lane & Ward (1984), em análise por microscopia eletrônica, sugeriram que estas manchas seriam locais de liberação de feromônio.

Os feromônios são um grupo de substâncias biologicamente ativas, que são secretadas por um indivíduo, lançadas para o ambiente que provocarão em outro indivíduo co específico determinada reação comportamental, ou um processo de desenvolvimento fisiológico definido (KARLSON & LÜSCHER, 1959). Estas substâncias estão presentes em vários grupos de insetos, inclusive entre os flebotomíneos, onde vários estudos envolveram algumas espécies, sendo os

primeiros trabalhos de descrição destes feromônios realizados por Phillips e colaboradores (1986).

Variações químicas já foram demonstradas entre o feromônio sexual de diferentes populações de *Lu. longipalpis*. Cinco quimiotipos de feromônios já foram identificados a partir de análises dos componentes do terpeno extraído das glândulas terçais desta espécie e foram divididos em: Quimiotipo 1 ou (S)-9-methylgermacrene-B (9MGB) encontrado em alguns estados do Brasil como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo e, também em outros países como Argentina, Colômbia, Paraguai, Honduras e Venezuela; Quimiotipo 2 ou (1S,3S,7R)-3-methyl- α -himachalene (3M α H) no estado da Bahia e na Venezuela; Quimiotipo 3 ou Sobraleno-1 (SOB-1) no Estado do Ceará, Pará, Alagoas, Espírito Santo e Minas Gerais; Quimiotipo 4 ou Sobraleno-2 (SOB-2) em Minas Gerais e São Paulo; Quimiotipo 5 ou 9MGB+, considerado análogo do Quimiotipo 1, no estado do Ceará e no norte de Minas Gerais (HAMILTON *et al.*, 1996a; HAMILTON *et al.*, 1996b; HAMILTON *et al.*, 1999a; HAMILTON *et al.*, 1999b; HAMILTON *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2005; WATTS *et al.*, 2005; ARAKI *et al.*, 2009).

Esta variação no feromônio sexual de *Lu. longipalpis* pode estar diretamente relacionada à epidemiologia da LV, já que há indícios de que populações com determinado feromônio teriam menor capacidade vetorial que outras (CASANOVA *et al.*, 2015). Apesar de muito se saber a respeito dos feromônios dentro do complexo *Lu. longipalpis*, pouco se sabe das estruturas responsáveis pela liberação dos semioquímicos.

Tendo como base da análise taxonômica dos seres vivos a comparação morfológica de organismos e suas estruturas, acreditamos que a melhor compreensão destas estruturas de liberação do feromônio dentro do complexo em questão seja de grande importância para auxiliar na separação de espécies.

Além da provável importância epidemiológica, faz-se necessário o desmembramento do complexo com a descrição das espécies que dele fazem parte seja utilizando-se da morfologia ou de aspectos bioquímicos e moleculares. É sabido que dois morfotipos de *Lu. longipalpis* são encontrados no município de Sobral, Ceará e que estas duas populações já se encontram isoladas sexualmente, comprovando que se trata de duas espécies com processo de especiação completo. Rego & Soares (2021) denotam a importância de estudos sobre este complexo, em

seu resumo, uma vez que existem ainda muitas lacunas a respeito deste complexo de espécies a serem elucidados e, apesar de já ser aceito que *Lu. longipalpis* se trata de um complexo de espécies, nenhuma proposta para desmembramento foi realizada até o momento.

1.2.2 Comportamento de voo e dispersão de flebotomíneos.

Os trabalhos de Quate (1964) no Velho Mundo foram pioneiros em analisar o comportamento de voo dos flebotomíneos, através de estudos de captura-marcação-soltura-recaptura. Posteriormente estes estudos foram realizados nas Américas (CHANOTIS, 1974; ALEXANDER, 1987; ALEXANDER E YOUNG, 1992; MORRISSON *ET AL.*, 1993) com resultados semelhantes, onde os flebotomíneos se dispersavam em sua maioria por 200 metros em área urbana (CASANOVA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2013) e, como mostrado por Dye *et al.* (1991), 700 metros em área rural.

Killick-Kendrick *et al.* (1986) foram pioneiros em demonstrar a possível interferência dos ventos na capacidade de voo dos flebotomíneos concluindo que estes insetos realizam voos de 2,3 a 2,5 km/h sem sofrer interferência do vento. Entretanto, Colacicco-Mayhugh *et al.* (2011), evidenciam coletas de flebotomíneos em índices de vento maiores que os mencionados anteriormente.

É dito na literatura científica (LAWYER E PERKINS, 2004) que os flebotomíneos são “mal voadores”. Este fato, de certa forma, é incoerente com a distribuição geográfica de certas espécies, que são observadas ao longo de todo o território brasileiro. Em um experimento piloto, foi instalada uma armadilha na região central do rio das Velhas, na região de Lassance em Minas Gerais, há cerca de 80 metros de cada margem. Foram capturados flebotomíneos neste teste, fato que impulsionou a realização de experimentos sistemáticos para o refinamento do estudo da capacidade de voo dos.

Estudos sobre a ecologia e comportamento de flebotomíneos geram perspectivas e auxiliam nas tomadas de decisões por parte dos gestores em relação à prevenção das leishmanioses, de forma eficaz e de acordo com a realidade do município.

1.3 Flebotomíneos de Lassance e a presença do complexo *Lutzomyia longipalpis*

O município de Lassance, Minas Gerais, localizado às margens do rio das Velhas e da Serra do Cabral, cobre uma área de 3204 km² e tem 6512 habitantes (IBGE, 2019). As atividades econômicas locais envolvem agricultura, pesca e criação de gado.

Nosso grupo de estudos vem desenvolvendo trabalhos científicos relacionados à fauna flebotomínica na região de Lassance, Minas Gerais, há alguns anos (SARAIVA *et al.*, 2008, 2009, 2012; CARVALHO *et al.*, 2011, 2012, 2013). O fato de possuir uma área relativamente bem preservada, a presença de um rio de grande porte, com cerca de 160 metros de largura entre suas margens e diversas cavernas gera uma grande diversidade na fauna flebotomínica. Ainda, em relação às leishmanioses, o município notificou 18 casos de LV e LT respectivamente entre os anos de 2010-2019 e apresenta uma alta prevalência de leishmaniose canina (Dados não publicados) o que indica a circulação do parasito no local, colocando em risco a saúde dos moradores.

De fato, uma nova espécie já foi encontrada em nossos trabalhos bem como a presença de espécies de flebotomíneos infectadas com *Leishmania* sp. na área próxima ao rio das Velhas foram registras (SARAIVA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011), entretanto não se tem dados a respeito da fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance.

Em todos ambientes analisados na região de Lassance foi encontrada a *Lu. longipalpis*, sendo que o feromônio da população urbana já foi caracterizado, sendo o Quimiotipo 1 (9MGB) (SPIEGEL *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017). Indivíduos machos de duas manchas já foram observados na região (dados não publicados) o que nos faz acreditar que, apesar deste fato não comprovar variação do feromônio no local, o complexo *Lu. longipalpis* esteja distribuído nesta região em diferentes quimiotipos de feromônio. Ainda, a melhor compreensão acerca do complexo *Lu. longipalpis* é necessária para fornecer melhores subsídios para estratégias de controle (BRAY *et al.*, 2014; BELL *et al.*, 2018). Ainda, estudos são necessários para avaliar uma possível circulação do parasito *Leishmania* em vetores em Lassance além de suas formas de transmissão e distribuição.

Em relação à capacidade de voo dos flebotomíneos, o rio das Velhas é ideal para a realização desses tipos de experimentos, pois através de metodologias apropriadas será possível verificar se ele representa uma barreira geográfica, dificultando a dispersão dos flebotomíneos, e, mensurar a capacidade de voo desses insetos. Além de o local nos permitir ter maior compreensão na capacidade de voo destes vetores e os resultados obtidos neste trabalho poderão permear novas diretrizes para ações de controle dos vetores das leishmanioses além de trazer para a secretaria de saúde e população local uma visão em relação à distribuição dos flebotomíneos na área urbana de Lassance.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a fauna e aspectos ecológicos dos flebotomíneos do município de Lassance, Minas Gerais, bem como analisar algumas considerações taxonômicas do complexo *Lutzomyia longipalpis*.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Determinar as espécies de flebotomíneos que ocorrem na área urbana do município de Lassance – MG;

2.1.2 Investigar a presença de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos capturadas;

2.1.2 Delimitar um mapa de risco de acordo com a abundância das espécies de flebotomíneos de importância médica.

2.1.3 Aferir a capacidade de voo dos flebotomíneos;

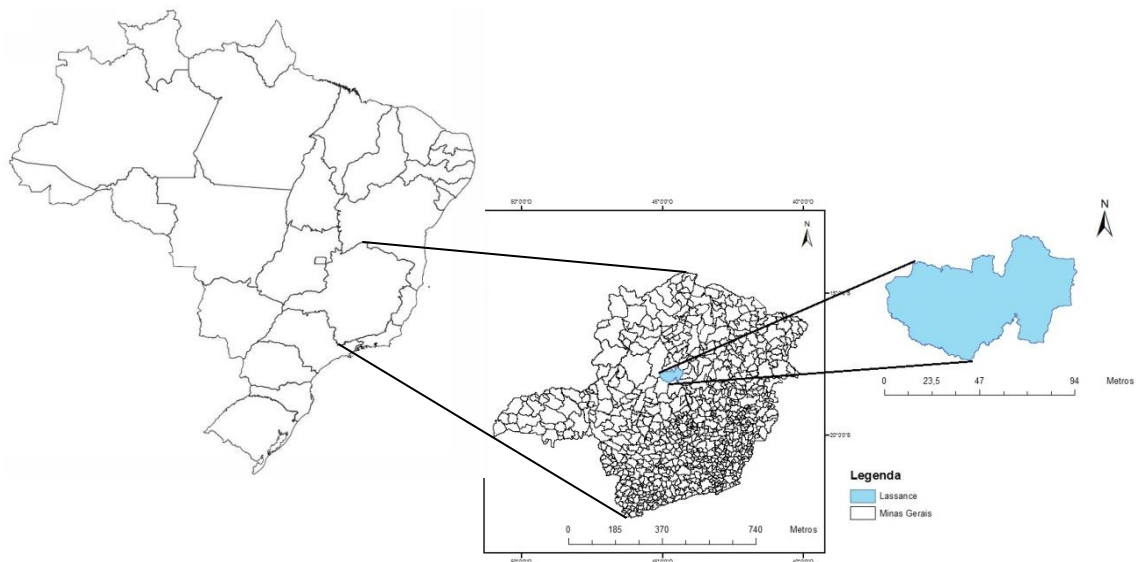
2.1.4 Estudar a morfologia das glândulas de feromônio do complexo *Lu. longipalpis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O município de Lassance está localizado na região norte do estado de Minas Gerais ($17^{\circ} 53' 13'' S / 44^{\circ} 34' 40'' O$), na microrregião de Pirapora (**Figura 9**), às margens do rio das Velhas. Tem relevo plano e bioma predominantemente de cerrado, apresentando 81% de arborização em suas vias públicas (IBGE, 2019) (**Figura 10**).

Figura 9: Localização do município de Lassance no Brasil e no Estado de Minas Gerais, Brasil.



Fonte: Dados da pesquisa.

Possui diversos pontos turísticos como, rios, cachoeiras e cavernas e, ainda, apresenta importância histórica e científica por ser o local de descoberta da doença de Chagas, quando em 1907, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, um jovem médico sanitarista do Instituto Oswaldo Cruz foi convidado a controlar a malária no vilarejo do norte de Minas (CHAGAS, 1922) (**Figura 11**).

Figura 10: Imagem aérea de Lassance feita por drone.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 11: Pontos turísticos localizados em Lassance – MG. A) Rio das Velhas. B) Memorial Carlos Chagas localizado na região central de Lassance, MG.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Estudo da fauna dos flebotomíneos na área urbana do município de Lassance.

3.2.1 Delineamento das capturas de flebotomíneos

Para o estudo da fauna dos flebotomíneos foram selecionados 8 domicílios como pontos amostrais na área urbana de Lassance (**Figura 12**). Esses pontos foram selecionados de acordo com características ambientais (presença de galinheiros, canis, quintais com plantações – situações que favorecem a presença dos flebotomíneos) e proximidade ou ocorrência de casos caninos e/ou humanos de leishmaniose, segundo a Secretaria Municipal de Saúde de Lassance.

Os pontos foram caracterizados de acordo com presença ou ausência de fatores que possam contribuir para a presença do vetor, como mostra a **Tabela 1**. Durante o período amostral, dados climáticos (temperatura média e pluviosidade) foram consultados no sistema do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET a partir da estação climática localizada em Curvelo - MG.

Tabela 1: Caracterização dos pontos amostrais do estudo da fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance, MG.

Ponto amostral	Árvore frutífera	Arbustos	Gramma	Cão	Galinha	Outros animais (n)
1	+	+		1		Gato (1)
2	+	+		1		
3	+	+				Cavalo (1)
4	+	+		2		Gato (4)
5	+	+		1	+	
6	+	+	+		+	
7	+	+			+	
8	+			1	+	Gato (3)

Figura 12: Distribuição das armadilhas para coleta de flebotomíneos no Município de Lassance, MG.



Fonte: Dados da pesquisa.

Uma armadilha luminosa do tipo HP foi utilizada em cada um dos pontos amostrais durante três noites consecutivas por mês durante maio de 2018 a abril de 2019 resultando em esforço amostral de 72 horas/mês de coleta (**Figura 13 - 20**). Os flebotomíneos coletados foram submetidos à triagem e sexagem e, posteriormente preparados em berlese entre lâmina e lamínula. Os indivíduos do sexo masculino foram montados utilizando todo o corpo e as fêmeas foram montadas apenas cabeça e os dois últimos segmentos abdominais e o restante foi separado para análise molecular. A identificação foi realizada seguindo-se a classificação de Galati (2018).

Testes em laboratório foram realizados previamente para validar a adaptação de pote coletor nas armadilhas utilizando tubo Falcon® (50 mL) contendo mistura de álcool glicerinado (20%). A adaptação mostrou-se útil para estudos faunísticos uma vez que os insetos capturados se mantêm em meio líquido o que preserva suas estruturas e facilita a triagem da amostragem.



Figura 13: Ponto amostral Casa 01. **A** e **B)** Quintal da residência referente ao ponto amostral Casa 01 na área urbana de Lassance com a armadilha luminosa tipo HP instalada.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 14: Armadilha instalada no ponto amostral Casa 2 em pequeno terreiro a frente da residência.



Fonte: Dados da pesquisa



A

Figura 15: Ponto amostral Casa 03. **A** e **B)** Quintal da residência na área urbana de Lassance mostrando riqueza em matéria orgânica e uma ampla área.



B

Fonte: Dados da pesquisa



Figura 16: Ponto amostral Casa 04. **Acima)** Frente do ponto amostral Casa 04, próximo à linha férrea no município de Lassance. **Abaixo)** Local para amostragem na Casa 04 com presença de vegetação e animal doméstico.

Fonte: Dados da pesquisa



Figura 17: Ponto amostral Casa 05. **A)** Entrada da residência com plantas frutíferas e amplo terreiro ao fundo. **B)** Armadilha luminosa tipo HP instalada em galinheiro no ponto amostral.

Fonte: Dados da pesquisa



Figura 18) Ponto amostral Casa 06. **A)** Entrada do ponto amostral Casa 06 com área verde seguida de uma horta e um galinheiro ao fundo. **B)** Armadilha luminosa tipo HP instalada em galinheiro no ponto amostral.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19: Ponto amostral Casa 07. **A)** Quintal do ponto amostral com área verde com árvores frutíferas, plantações e galinheiro. **B)** Armadilha luminosa tipo HP instalada em frente ao galinheiro.



Fonte: Dados da pesquisa

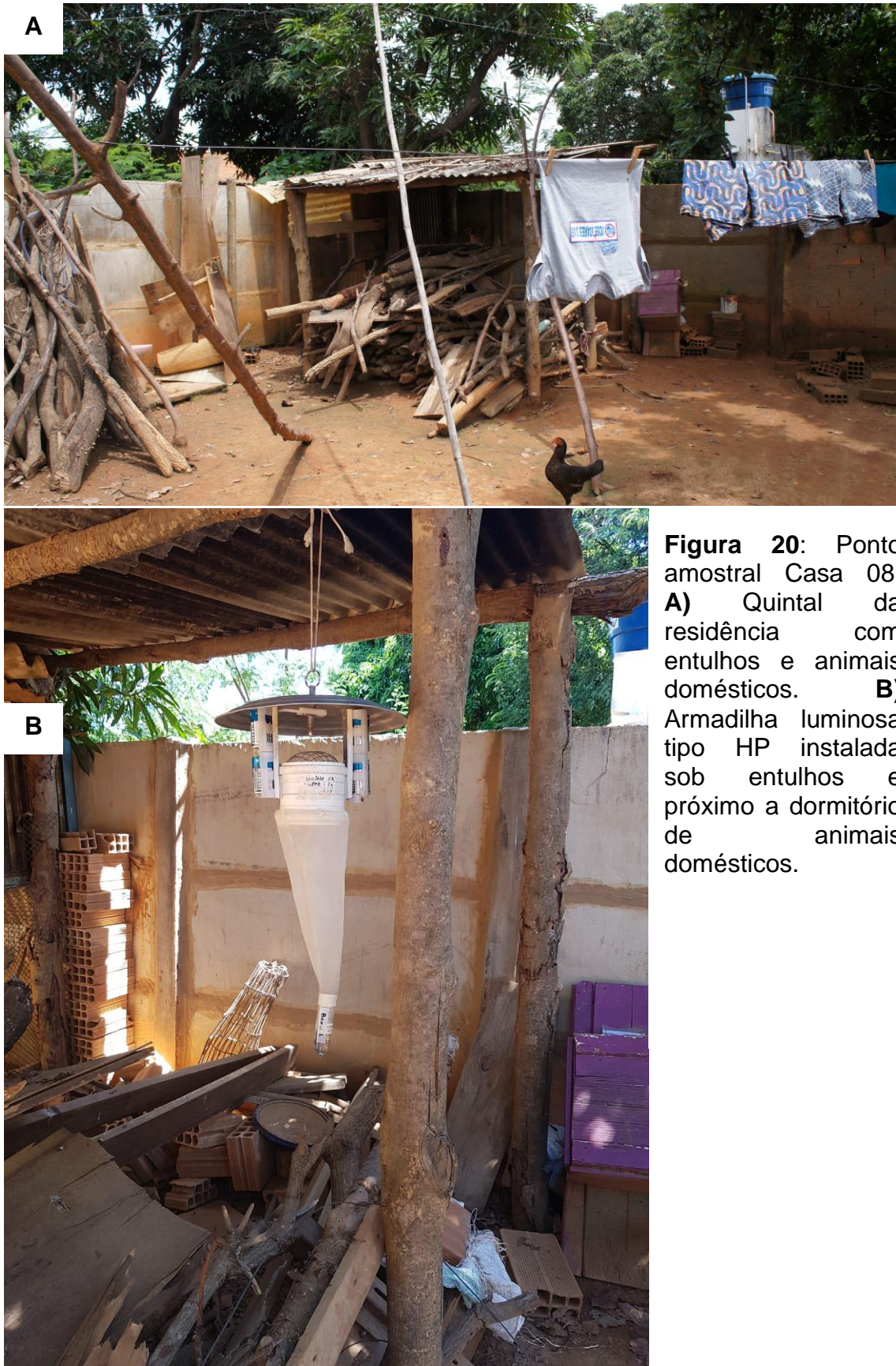


Figura 20: Ponto amostral Casa 08. **A)** Quintal da residência com entulhos e animais domésticos. **B)** Armadilha luminosa tipo HP instalada sob entulhos e próximo a dormitório de animais domésticos.

Fonte: Dados da pesquisa

3.2.2. Análises estatísticas

A equitabilidade da população de flebotomíneos nos diferentes pontos amostrais da área de estudo foi determinada pelo Índice de Pielou (J), baseado na abundância de cada espécie.

A análise de similaridade para ocorrência e abundância relativa das espécies de flebotomíneos entre diferentes ambientes dos pontos amostrais foram determinadas pelo Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) por meio de uma matriz de dissimilaridade calculada segundo os índices de Jaccard (com dados de presença ou ausência das espécies) e de Bray-Curtis (com dados de abundância relativa das espécies) valores de stress de 0,08 e 0,06 respectivamente.

As análises estatísticas foram realizadas através dos pacotes Vegan no software R 3.2.4 (R Development Core Team 2016).

3.2.3. Detecção de DNA de *Leishmania* nos flebotomíneos coletados e cálculo da taxa de infecção

O DNA total foi extraído a partir das fêmeas coletadas, de forma individual ou em pools para amostragens maiores que 10 indivíduos referentes ao mesmo local e data de coleta, utilizando o KIT Genra Puregene (Qiagen, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

Foi realizada amplificação do fragmento da região intergênica do DNA de *Leishmania* (Internal Transcribed Spacer – ITS1) utilizando os primers LITSR: 5´ CTGGATCATTTTCCGATG 3´ e L5.8S: 5´ TGATACCACTTATCGCACTT 3´ (EL TAI *et al.*, 2000; SCHONIAN *et al.*, 2003) e a análise visual se deu através de eletroforese em gel de agarose 2%.

Para identificação da espécie de *Leishmania*, o produto amplificado foi digerido utilizando a enzima *HaeIII* (10U / µL), seguindo as recomendações do fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Os padrões de restrição foram analisados em gel de agarose a 4% corado com 7µL de brometo de etídio (10mg/mL) em comparação com as cepas de referências de *Leishmania* spp.: *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

A taxa de infecção foi calculada considerando as amostras positivas na detecção de DNA de *Leishmania* sp. em relação ao número total de amostras analisadas.

3.2.4 Determinação de áreas de risco

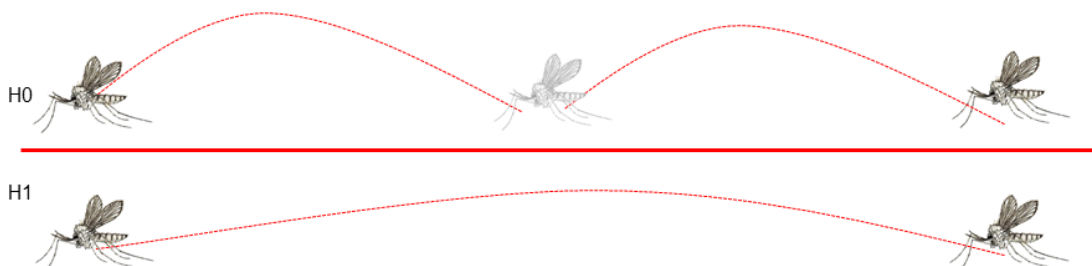
De acordo com a abundância das espécies de importância médica ao longo dos pontos amostrais na área de estudo e resultados das análises moleculares de detecção de DNA de *Leishmania* sp. foi elaborado um mapa das áreas de risco no município de Lassance – MG.

3.3 Estudo da capacidade de voo dos flebotomíneos

3.3.1 Análise da capacidade de voo por interceptação em meio aquático

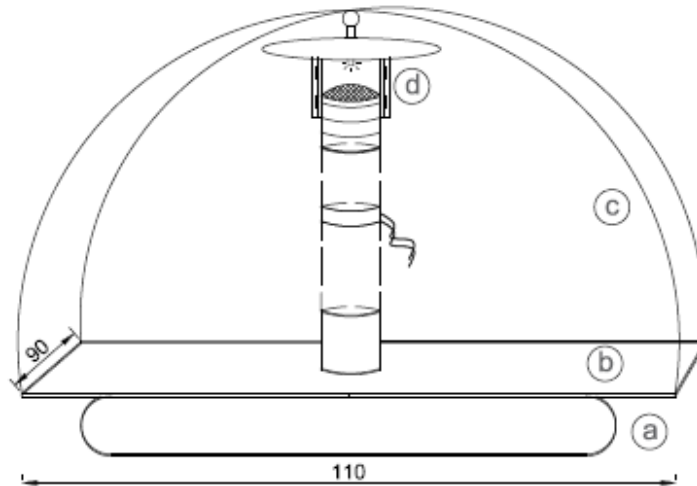
Para se verificar a capacidade de voo dos flebotomíneos, seguindo nossas hipóteses (**figura 21**), três coletas não sistematizadas foram realizadas nos meses de maio de 2017, janeiro e julho de 2018 com esforço amostral de 68 horas por coleta. Para tal, foi desenvolvido um suporte para as armadilhas serem instaladas em meio aquático e permanecerem ancoradas (**Figura 22**).

Figura 21: Hipóteses a serem testadas no estudo de capacidade de voo dos flebotomíneos. H0: os flebotomíneos realizam voo por longa distância em forma de saltos. H1: os flebotomíneos realizam voo de forma contínua.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 22: Suporte desenvolvido para realizar estudo de capacidade de voo dos flebotomíneos utilizando meio aquático como barreira. **a)** câmara de ar de caminhão; **b)** chapa de madeira tamanho 110 cm x 90 cm; **c)** arame 3,17 mm cruzados sobre a chapa de madeira; **d)** armadilha luminosa do tipo HP.

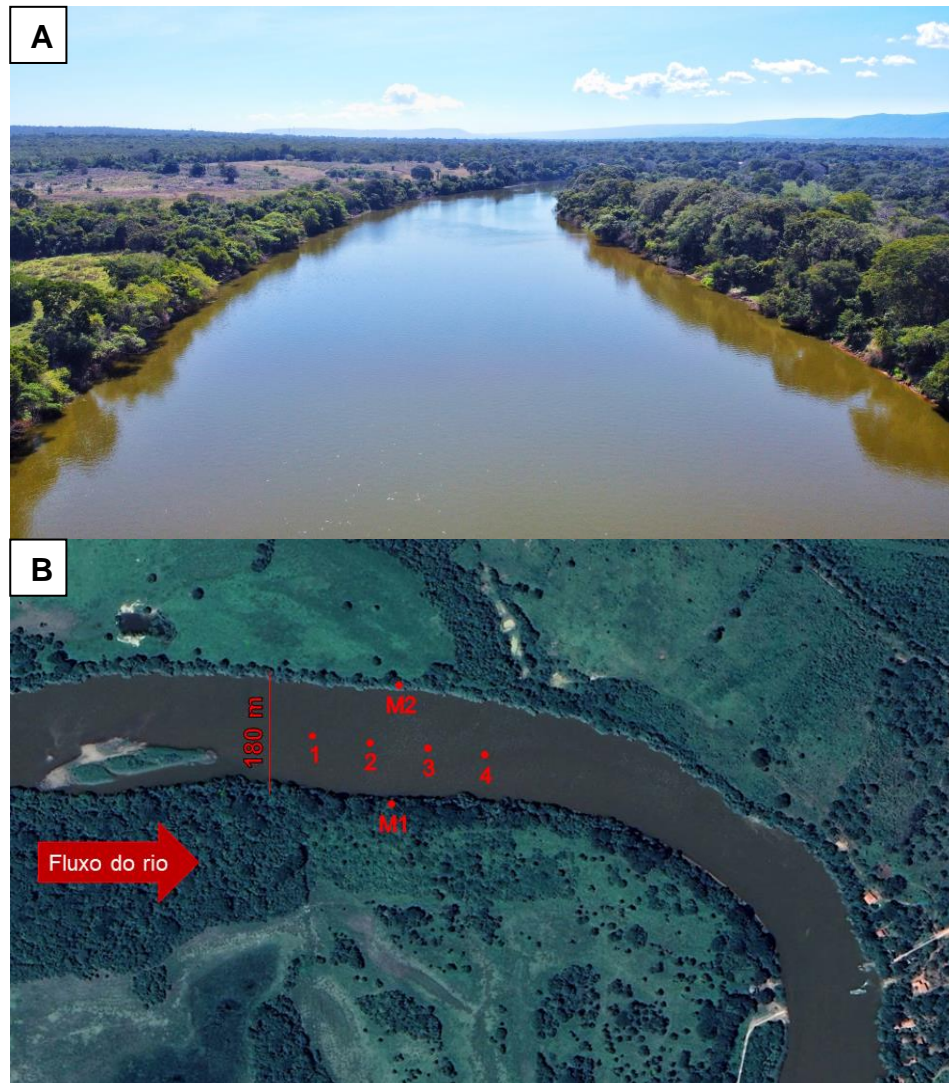


Fonte: Dados da pesquisa

Foi selecionado um trecho de menor curvatura possível do rio com distância maior que 500 metros de extensão e 180 metros de largura e, com auxílio de um barco, quatro armadilhas luminosas do tipo HP foram dispostas na região central do rio, a 80 metros equidistantes entre si e, ainda, foi instalada uma armadilha em cada margem (**Figura 23 e 24**). A fim de evitar contaminação e aperfeiçoar a amostragem, foram selecionadas armadilhas específicas para cada ponto amostral (região central do rio e margens) e as mesmas eram levadas desmontadas e desligadas até o ponto de captura e durante período de alta incidência de luz solar.

A distância entre as armadilhas e as margens do rio das Velhas foi feita com uso de GPS. Ainda, foram utilizados anemômetro e registros do aplicativo Windy® para medir a intensidade e direção do vento durante o período de coleta e verificar a possível influência ou não deste sobre a capacidade de voo dos flebotomíneos.

Figura 23: Região utilizada para estudo da capacidade de voo e pontos de coleta ao longo do Rio das Velhas, em Lassance. **A)** Imagem aérea capturada por drone do local no rio das Velhas utilizado para o desenvolvimento do estudo (Foto do autor). **B)** Distribuição das armadilhas para captura onde **1 – 4:** localização dos pontos amostrais. **M1:** localização do ponto amostral na Margem 1. **M2:** localização do ponto amostral na Margem 2. A seta vermelha representa o sentido do rio.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 24: Armadilha instalada em região central do Rio das Velhas em Lassance, MG. Ao fundo pode-se observar outra armadilha instalada a 80 metros de distância.



Fonte: Dados da pesquisa

3.3.2 Análise de capacidade de voo por captura, marcação e recaptura.

Para analisar a capacidade dos flebotomíneos em realizar voos maiores que 100m de distância de forma contínua, foi selecionado um local onde havia disponibilidade de locais com alto potencial de presença de flebotomíneos e próximo à margem do rio das Velhas. O local selecionado foi a Pousada Tia Maria, à margem do rio, onde eram encontrados galinheiro, cães e árvores frutíferas, além de toda estrutura para realização do trabalho (**Figura 25**).

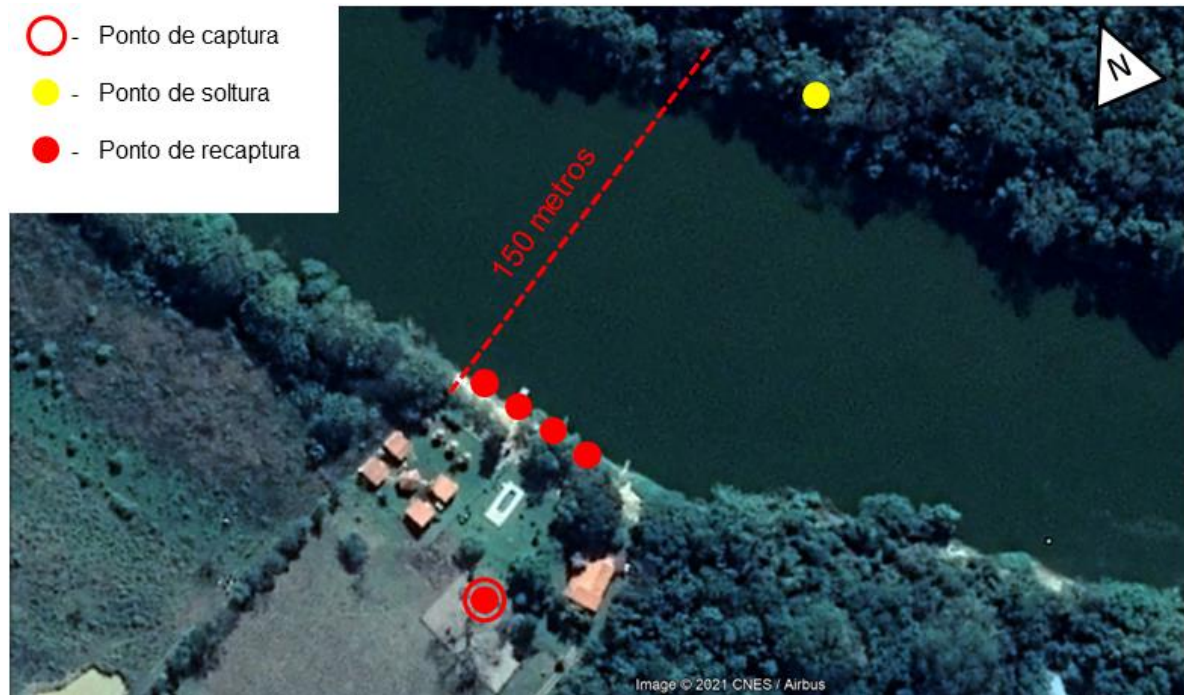
Figure 25: Vista panorâmica do rancho Tia Maria na margem 2 do rio das Velhas em Lassance, MG. O círculo vermelho denota a localização do galinheiro onde as coletas de flebotomíneos foram realizadas.



Fonte: Dados da pesquisa

Coletas foram realizadas nos meses de agosto de 2020 a março de 2021. A captura de dípteros foi realizada no galinheiro (na margem 2) utilizando três armadilhas luminosas do tipo HP além de captura ativa com capturador de Castro nas adjacências da residência e com uso de armadilha de Shannon, com esforço amostral de 48 horas consecutivas por mês de coleta. Os insetos capturados foram armazenados vivos em pote de criação, alimentados com solução açucarada e mantidos em caixa térmica. Os insetos foram marcados dentro dos potes de criação com pó fluorescente (Luminous Paint kit, Bioquip®), com auxílio de borrifador de plástico em formato de pera. As cores de marcação foram alternadas entre os meses (vermelho amarelo e azul). Após a marcação os insetos foram soltos na margem 1 do rio das Velhas e as armadilhas de recaptura foram dispostas na margem 2, no galinheiro e em seus arredores (**Figure 26**). As tentativas de recaptura foram realizadas durante dois dias a partir do dia de soltura e 20 dias após a mesma.

Figure 26: Delineamento da análise da capacidade de voo dos flebotomíneos por captura, marcação, soltura e recaptura. O círculo vermelho, localizado no galinheiro da pousada na margem 2, representa o ponto de captura. O ponto amarelo, localizado na margem 1 a 150 metros de distância da margem 2, representa o local de soltura dos flebotomíneos marcados. Os pontos vermelhos representam os locais de distribuição de armadilhas para tentativas de recapturas dos insetos marcados.



Fonte: Dados da pesquisa

Com auxílio de lanterna de luz ultravioleta (UV) (Bioquip®) os flebotomíneos capturados foram analisados em microscópio estereoscópio para observação de marcação fluorescente. Posteriormente foram preparados, montados entre lâmina e lamínula e fixados em solução de Berlese. Estes insetos foram identificados seguindo a classificação proposta por Galati (2018).

3.4 Estudo morfológico das glândulas de feromônio do complexo *Lu. longipalpis*

Este estudo foi inicialmente realizado na Universidade de Lancaster - UK mediante aprovação no edital CAPES/PRINT nº41/2017 sob orientação do Dr. Gordon Hamilton entre outubro de 2019 e março de 2020. Foi analisada a morfologia das estruturas responsáveis pela liberação do feromônio, localizadas nas regiões

das manchas abdominais, em machos do complexo *Lu. longipalpis* através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Ainda, machos de *Lu. longipalpis* foram coletados no ponto amostral casa 06 em Lassance – MG para análise morfológica dos membros do complexo desta região.

3.4.1 Delineamento do estudo

Machos de *Lu. longipalpis* da colônia de flebotomíneos da Universidade de Lancaster – UK, mantida há mais de dez anos, provenientes de Campo grande – MS, Jacobina – BA e Sobral – CE foram utilizados para a análise. Os *Lu. longipalpis* analisados representam 3 dos 5 quimitipos de feromônio encontrados no Brasil (**Tabela 2**). As colônias eram mantidas em $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ umidade relativa (UR) e foto período de 12h:12h claro:escuro (C:E). Todos os machos das três colônias foram morfológicamente classificados como duas manchas (2S).

Tabela 2: Local de coleta original e tipo de feromônio dos membros do complexo de espécies de *Lu. longipalpis* mantidos em colônia na Universidade de Lancaster - UK utilizados no estudo.

Local de origem	Coordenadas	Tipo do feromônio
Campo Grande - MS	20° 28'S, 54° 37'W	(S)-9-methylgermacrene-B (9MGB)
Jacobina - BA	11° 11'S, 40° 31'W	3-methyl- α -himachalene (3MH)
Sobral - CE	3° 41'S, 40° 20'W	Sobralene (SOB)

Fonte: Dados da pesquisa

Os flebotomíneos utilizados foram retirados da colônia 7 dias após emergirem e foram sacrificados a -5°C em freezer por 20 minutos. Foram, então, armazenados em tubos contendo hexano em freezer a -20°C até o processo de dissecação. Flebotomíneos machos da espécie *Lu. longipalpis* foram capturados no ponto amostral casa 06 em Lassance e mantidos em hexano e armazenados em freezer -20°C até o processo de dissecação.

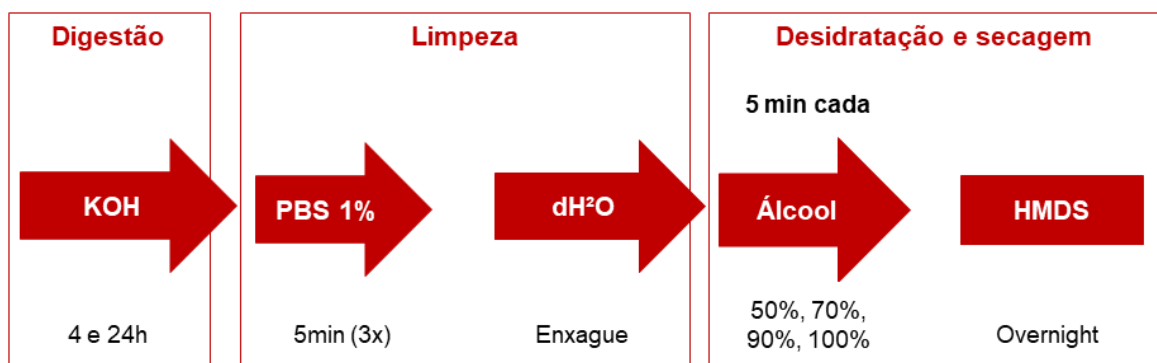
3.4.2 Dissecção

Para preparar os machos de flebotomíneos para MEV, o inseto foi disposto em uma gota de solução salina a 1% (PBS 1%) em lâmina de microscopia. O abdômen inteiro ou o terceiro e quarto tergito foi removido do restante do animal utilizando agulhas entomológicas em uma lupa óptica (Stemi 508, Carl Zeiss Ltd, Cambridge, UK) e, então, o interior do abdômen foi exposto após uma incisão dorsoventral.

3.4.3 Limpeza e desidratação do abdômen de flebotomíneo

Para remover as partes moles que cobrem as estruturas cuticulares internas no abdômen do flebotomíneo, as amostras de abdômen previamente dissecadas foram submetidas a um processo de limpeza em banhos de Hidróxido de Potássio 10% (KOH 10%) por 4 ou 24 horas, PBS 1% (3 sequências de 5 minutos cada) e enxague em água destilada. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação com banhos em álcool (50%, 70%, 90% e 100%) por cinco minutos em cada, seguidos de processo de overnight em hexamethildisilazane (HMDS) (**Figura 27**).

Figura 27: Fluxograma da metodologia para remoção das partes moles do interior do abdômen do flebotomíneo.



Fonte: Dados da pesquisa

3.4.4 Análise de ultraestrutura

Após o processo de limpeza e desidratação, as amostras foram montadas em suportes de MEV em fita adesiva de dupla face e cobertos com ouro (20nm) em metalizadora (Edwards S150A; Edwards UK, Burgess Hill, UK e QT150 ES - Quorum). As amostras foram, então, analisadas em microscópios eletrônicos de varredura (JEOL JSM-7800F e JEOL JSM-5610; Jeol (UK) Ltd, Welwyn Garden City, UK e Quanta 450 FEG - FEI) operados a 18kV. No total, 10 espécimes foram utilizados para o procedimento sendo 3 de Campo Grande, 3 de Jacobina, 2 de Sobral e 2 de Lassance.

3.4.5 Medidas das estruturas da glândula de feromônio

Para análise quantitativa e morfológica de estruturas na superfície cuticular interna abdominal, foram selecionadas, de forma randômica, 10 imagens digitais dos indivíduos analisados provenientes da colônia de flebotomíneos da Universidade de Lancaster utilizando o software Image J®. Devido às dificuldades encontradas na situação da pandemia do COVID-19, não foi possível realizar análises comparativas da morfologia das estruturas nos espécimes provenientes de Lassance – MG.

Quatro parâmetros foram considerados e medidos a partir do aparato secretor: largura, altura, comprimento do reservatório e ducto cuticular e comprimento do aparato secretor. Um total de 600 medidas foram realizadas nas 3 diferentes populações de *Lu. longipalpis*.

A comparação do tamanho das estruturas da glândula de feromônio foi realizada através de Modelos Lineares Generalizados (MLG). As medidas de cada segmento das estruturas foram utilizadas como variáveis de resposta, enquanto as colônias foram consideradas como variáveis de explicação. Para determinar a diferença entre as medidas foi utilizado o teste de Tukey.

Todas as análises foram realizadas através do R (v3.6.1, R Development Core Team 2016), seguindo por análise residual para padronizar a distribuição de dados.

3.5. Licenças e aspectos éticos

Os flebotomíneos coletados serão depositados na Coleção de Flebotomíneos do Instituto René Rachou/Fiocruz. O Coordenador possui ainda licença permanente do IBAMA para realizar as coletas de flebotomíneos, (número 15237-1) (**Apêndice 1**).

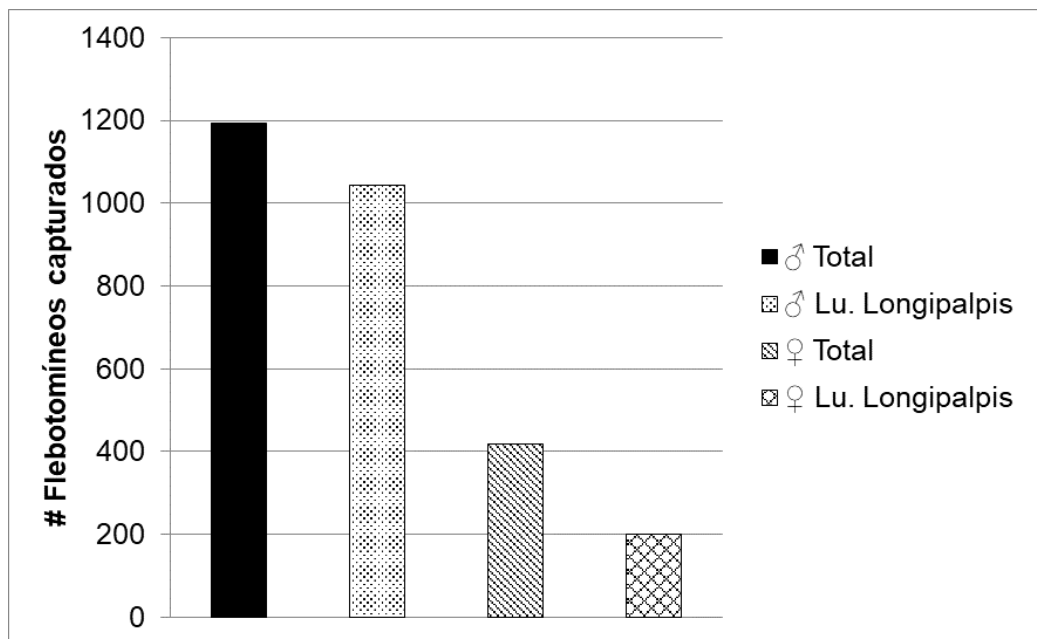
4. RESULTADOS

4.1. A fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance

Durante o período amostral foi coletado um total de 1.611 espécimes de flebotomíneos nas casas da região urbana do município de Lassance sendo os pontos de maior abundância a casa 6 (81,81%) e casa 4 (11,67%). Foi observada uma riqueza de 21 espécies de flebotomíneos na área de estudo compreendida em 8 gêneros. As espécies de maior abundância foram *Lu. longipalpis* (77,09%) e *Nyssomyia intermedia* (10,06%) (**Tabela 3**).

Em relação à espécie *Lu. longipalpis*, foi observada maior abundância de indivíduos macho (74,12%) em uma proporção aproximadamente de duas vezes o número de fêmeas (25,88%), ainda, observamos maior abundância da espécie em relação ao total amostrado de acordo com o sexo (machos = 87,27% e fêmeas = 47,96%) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: Proporção amostral de flebotomíneos machos e fêmeas capturados durante o estudo da fauna na área urbana do município de Lassance, MG, em relação ao número amostrado de indivíduos do complexo *Lu. longipalpis*.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3: Flebotomíneos coletados no estudo da fauna no período de maio de 2018 a abril de 2019 na área urbana de Lassance - MG.

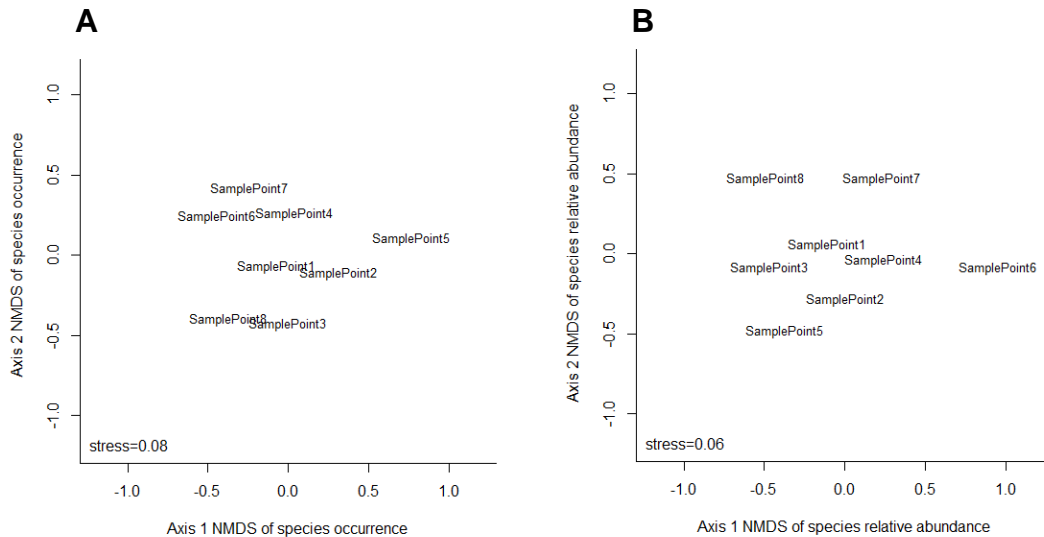
Flebotomíneos	Pontos amostrais								Total	%
	1	2	3	4	5	6	7	8		
<i>Brumptomyia avelari</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,06
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	-	-	2	-	2	-	-	4	0,25
Complexo <i>cortelezzii</i> *	3	1	2	20	5	10	1	3	45	2,79
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	0,12
<i>Ev. evandroi</i>	1	-	-	7	-	3	6	-	17	1,06
<i>Ev. lenti</i>	2	-	2	9	-	2	5	4	24	1,49
<i>Ev. sallesi</i>	1	2	3	21	5	15	1	-	48	2,98
<i>Ev. termitophila</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	3	0,19
<i>Ev. walkeri</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	0,06
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	4	4	2	77	4	1143	5	3	1242	77,09
<i>Micropigomyia oliveirai</i>	-	2	-	2	1	-	-	-	5	0,31
<i>Micropigomyia quinquefer</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,06
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1	1	-	33	1	121	2	3	162	10,06
<i>Nyssomyia neivai</i>	-	-	-	-	-	13	-	-	13	0,81
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,06
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	1	1	1	2	-	-	1	7	0,43
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	2	1	13	-	9	-	9	35	2,17
Total	15	14	12	188	20	1318	20	24	1611	
%	0,93	0,87	0,74	11,67	1,24	81,81	1,24	1,49		

*agrupamento formado por fêmeas das espécies *Ev. sallesi* e *Ev. cortelezzii* devido a semelhança morfológica de suas espermatecas dificultando a precisão da análise taxonômica.

Fonte: Dados da pesquisa

O índice de uniformidade (J) foi baixo para a área de estudo ($J' = 0,34$). Esse resultado mostra que as abundâncias das espécies nos diversos pontos amostrais não foram semelhantes, sendo *Lu. longipalpis* a espécie dominante. A análise de Similaridade do NMDS realizada com base nos dados de ocorrência e abundância relativa das espécies de flebotomíneos por armadilha entre os pontos amostrais, explicou 74% e 92% da variação dos dados com valores de stress de 0,08 e 0,06, respectivamente. Os percentuais de explicação e os valores de stress são considerados bons, uma vez que revelam uma alta probabilidade de que a análise de similaridade realizada reflita a realidade dos ambientes estudados. O NMDS revelou uma forte tendência de similaridade na composição e abundância relativa das espécies de flebotomíneos entre os diferentes pontos amostrais da área urbana de Lassance, o que sugere que todos esses ambientes são favoráveis para a manutenção das comunidades de espécies de flebotomíneos na área de estudo **(Figure 28)**.

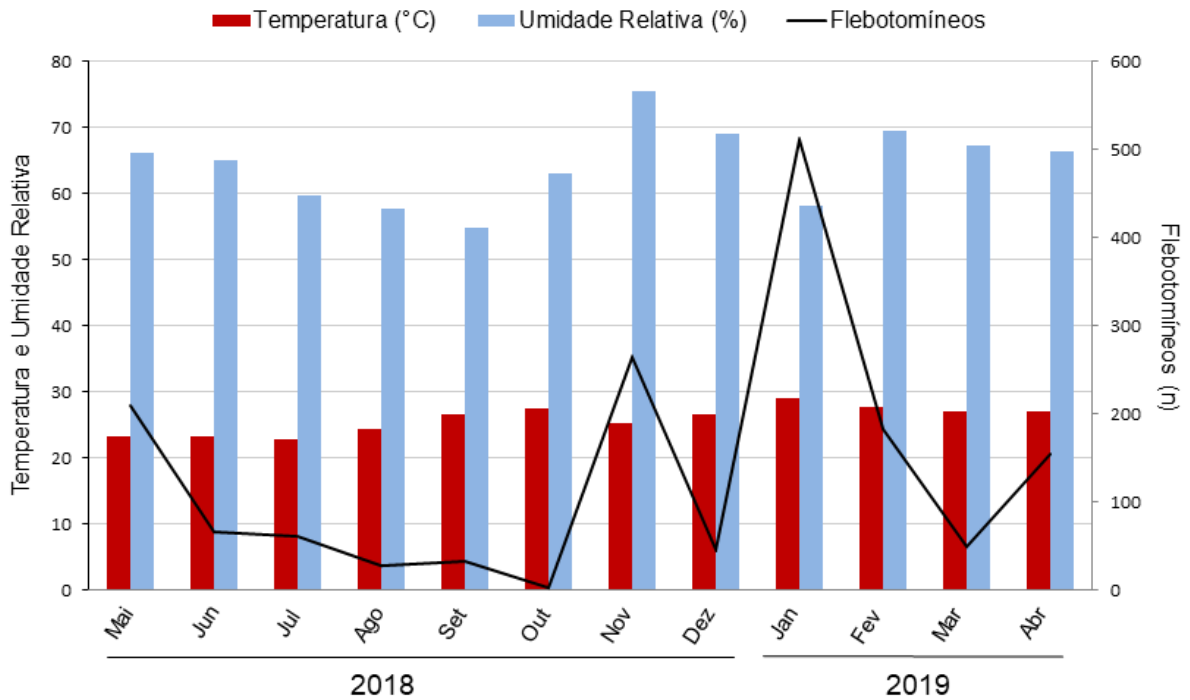
Figura 28: NMDS da ocorrência e abundância de flebotomíneos em relação aos pontos amostrais na área urbana de Lassance, MG. **A)** NMDS da ocorrência de flebotomíneos com nível de stress = 0,08. **B)** NMDS da abundância de flebotomíneos com nível de stress = 0,06.



Fonte: Dados da pesquisa

Os dados climáticos e pluviométricos observados a partir do INMET, durante o período de estudo, indicaram os meses mais quentes como Janeiro de 2019 (28,9°C) e Fevereiro de 2019 (27,8°C). Em relação aos meses de maior umidade do ar, observamos Novembro de 2018 (75,4%), Dezembro de 2018 (69%) e Fevereiro de 2019 (69,4%) e os meses de menor umidade relativa observados foram Agosto de 2018 (57,7%) e Setembro de 2018 (54,8%) (**Gráfico 2**).

Gráfico 2: Distribuição mensal da fauna flebotomínica durante o período amostral no município de Lassance, MG. O eixo y esquerdo corresponde aos valores para as variáveis: Temperatura média (°C) e Umidade relativa (%). Já o eixo y direito corresponde ao número de flebotomíneos coletados.



Fonte: Dados da pesquisa

4.2. Detecção molecular de *Leishmania* sp. e determinação de área de risco

Um total de 427 amostras foram testadas para detecção de DNA de *Leishmania* sp. utilizando o alvo ITS1.

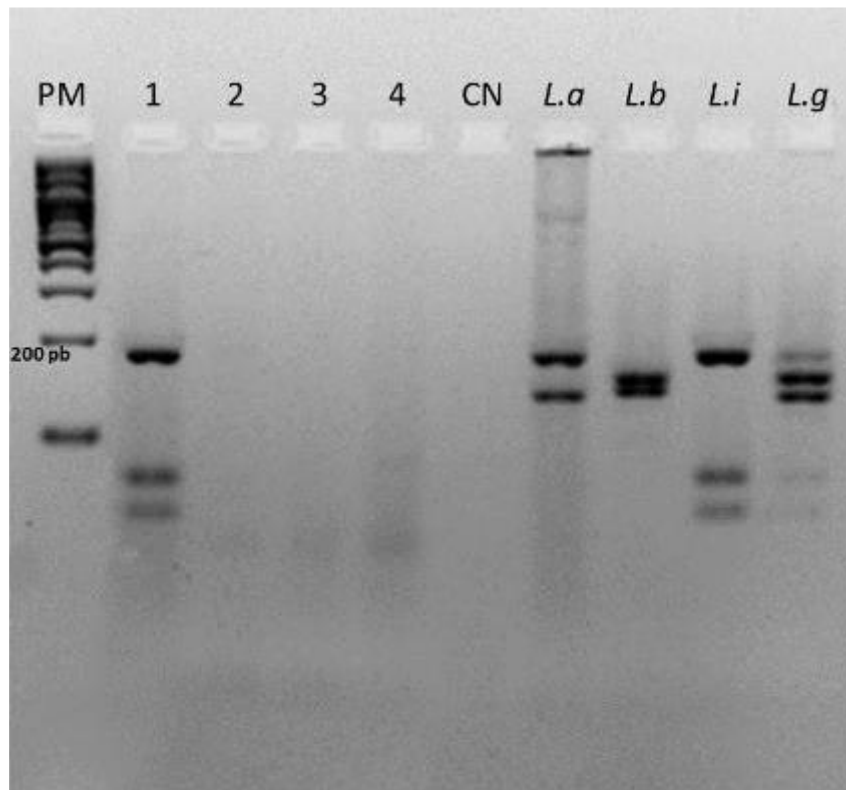
Das amostras analisadas, 9 foram detectadas com DNA de *Leishmania* sp., resultando em taxa de infecção (TI) de 2,10% (9/427), com predominância de amostras positivas na casa 6 (n = 4) e casa 8 (n = 3) e a espécie de flebotomíneo mais abundante dentre as positivas na PCR foi *Lu. longipalpis*. Em uma amostra proveniente da casa 06, organizada em pool, obtida no período amostral do mês de março de 2019, foi o DNA amplificado foi caracterizado como da espécie *Le. infantum* através da metodologia PCR RFLP (Tabela 4) (Figura 29).

Tabela 4: Detecção de DNA de *Leishmania* por PCR ITS1 e caracterização através de restrição de fragmento pela enzima *HaeIII*. As amostras organizadas em pool de 10 indivíduos estão marcadas por *.

Ano	Mês	Ponto amostral	Flebotomíneo	Espécie de <i>Leishmania</i>
2018	Março	8	<i>Lu. longipalpis</i>	-
	Junho	6	<i>Ny. intermedia</i> *	-
	Julho	4	Complexo Cortelezzii	-
	Setembro	6	<i>Lu. longipalpis</i> *	-
		6	<i>Lu. longipalpis</i> *	-
2019	Fevereiro	8	<i>Sc. sordellii</i>	-
	Março	4	Complexo cortelezzii	-
		6	<i>Lu. longipalpis</i> *	<i>Le. infantum</i>
		8	<i>Lu. longipalpis</i>	-

Fonte: Dados da pesquisa

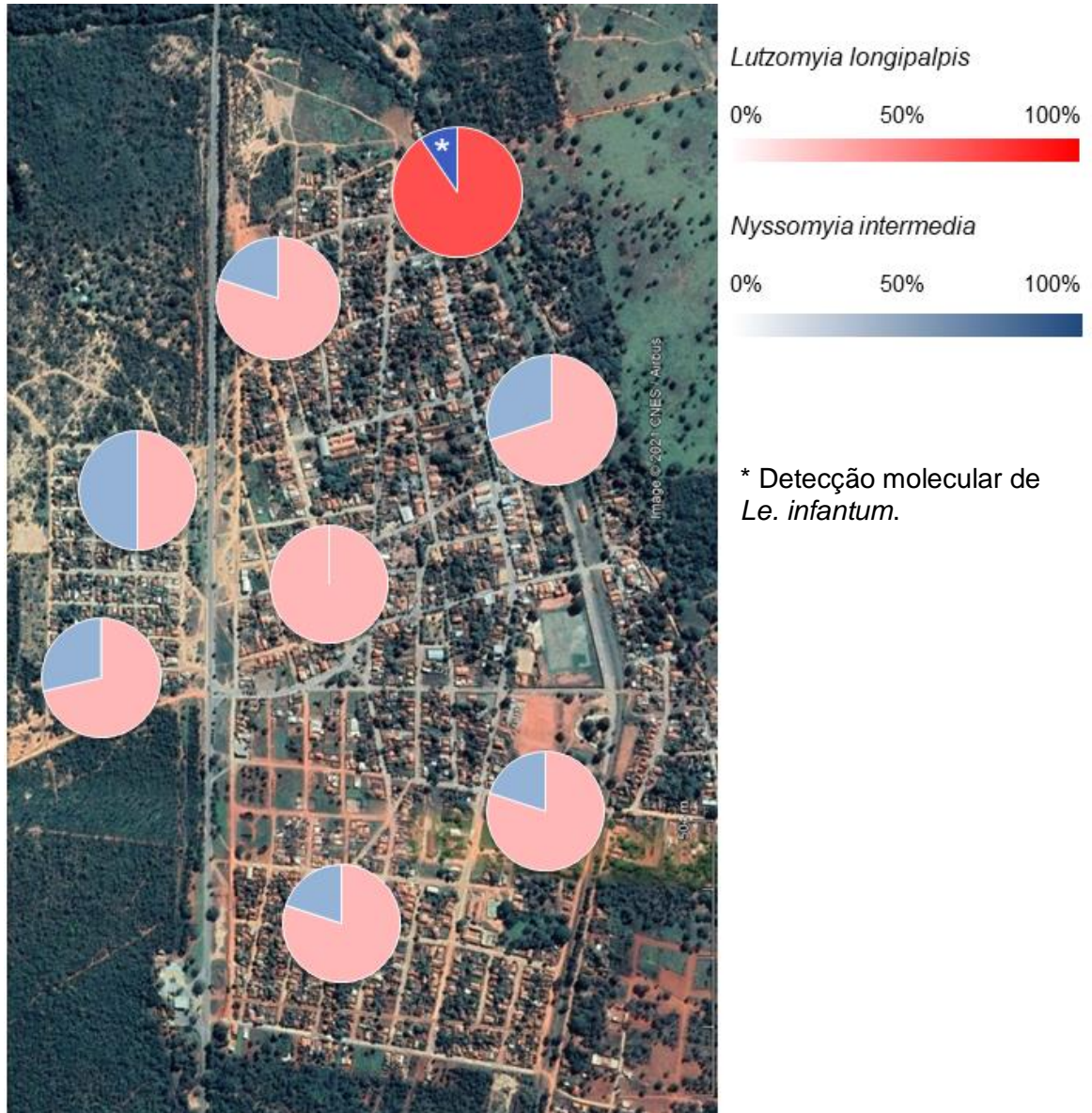
Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 4% da PCR RLFP das amostras organizadas em Pool. Canaleta 1: *Lu. longipalpis* (casa 06, março de 2019), canaleta 2 e 3: *Lu. longipalpis* (casa 06, setembro de 2018) e canaleta 4: *Ny. intermedia* (casa 06, junho de 2018); CN corresponde ao controle negativo; *L.a*, *L.b*, *L.i* e *L.g* = cepas de referência correspondentes as espécies *Le. amazonensis*, *Le. brasiliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis*.



Fonte: Dados da pesquisa

Baseado na frequência das espécies mais abundantes no estudo, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, em relação ao local de captura, propomos um mapa de áreas de risco (**Figura 30**).

Figura 30: Áreas de risco de transmissão de leishmanioses na área urbana de Lassance, MG, de acordo com frequência das espécies de flebotomíneo *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*. A abundância da espécie de acordo com o ponto amostral é demonstrada em (%) pela barra vermelha (para *Lu. longipalpis*) e azul (para *Ny. intermedia*)









Fonte: Dados da pesquisa

4.3 Capacidade de voo dos flebotomíneos

Durante o período amostral da análise da capacidade de voo dos flebotomíneos, os ventos atuaram predominantemente na direção Noroeste, sentido margem 1 para margem 2, com uma média da velocidade de 0,8 km/h apresentando rajadas de vento ao longo do dia de 12,3 km/h. O ranking de mês de maior intensidade dos ventos foi janeiro de 2018 (1,2 km/h), julho de 2018 (0,7 km/h) e maio de 2017 (0,6 km/h). A temperatura máxima observada durante o período amostral foi de a.v. 26,6°C enquanto a mínima foi de a.v. 17°C. Exceto pelo primeiro mês de coleta, em que a Lua se encontrava em fase crescente, durante os outros meses se encontrava em fase nova (**Tabela 5**). Não houve precipitações durante os períodos amostrais.

Tabela 5: Comportamento do vento, temperatura e fase lunar durante a análise de capacidade de voo dos flebotomíneos em Lassance – MG nos meses de maio de 2017, janeiro de 2018 e julho de 2018. Dados coletados por anemometro e aplicativo Windy®.

Período amostral	Vento (rajadas)	Direção	Temperatura (°C)	Fase lunar
Maio 2017	0.6 km/h (12 km/h)		max: 27° min: 17°	 Crescente
Janeiro 2018	1.2 km/h (14 km/h)		max: 27° min: 19°	 Nova
Julho 2018	0.7 km/h (11 km/h)		max: 26° min: 15°	 Nova

Fonte: Dados da pesquisa

Durante o período amostral, no estudo da capacidade de voo, um total de 804 flebotomíneos foi coletado. Destes, 580 (65,67%) foram capturados na Margem

direita (M1), 270 (33,58%) na margem esquerda (M2) e seis espécimes (0,75%) na região central do rio. As espécies de maior abundância foram *Ny. neivai* (63,43%) e *Ny. intermedia* (22,64%). Dos seis espécimes capturados na região central do rio, a mais abundante foi *Ny. neivai* (66,66%) seguido de *Ev. lenti* e *Ny. intermedia* (33,33%) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Flebotomíneos coletados na análise da capacidade de voo no rio das Velhas, Lassance - MG. **1 – 4** representam os pontos amostrais. **M1 e M2** representam a Margem 1 e a Margem 2 respectivamente.

Espécies por ponto amostral	1	2	3	4	M1	M2	TOTAL	%
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	-	-	-	-	1	1	0,12
Complexo cortelezzi	-	-	-	-	5	2	7	0,87
<i>Evandromyia evandroi</i>	-	-	-	-	3	-	3	1,37
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	-	-	6	4	11	1,37
<i>Evandromyia sallesi</i>	-	-	-	-	21	36	57	7,09
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,12
<i>Evandromyia termitophila</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,12
<i>Evandromyia walkeri</i>	-	-	-	-	25	2	27	3,36
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,12
<i>Nyssomyia intermedia</i>	-	-	-	1	151	30	182	22,64
<i>Nyssomyia neivai</i>	4	-	-	-	314	192	510	63,43
<i>Pintomyia misionensis</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,12
<i>Sciopemyia sordellii</i>	-	-	-	-	-	2	2	0,25
TOTAL	5	0	0	1	528	270	804	100

Fonte: Dados da pesquisa

Todos os espécimes da espécie *Ny. neivai* e *Ev. lenti* capturados na região central do rio foram obtidos em maio de 2017 no ponto amostral 1 enquanto o espécime de *Ny. intermedia* foi capturado em janeiro de 2018 no ponto amostral 4. A coleta referente ao mês de julho de 2018 não obteve sucesso amostral na região central do rio.

Em relação às análises de captura, marcação e recaptura, aproximadamente 1450 espécimes de flebotomíneos foram capturados, através de armadilha de Shannon e armadilha luminosa tipo HP, e soltos entre os meses de agosto (\cong 500) e dezembro de 2020 (\cong 630), fevereiro (\cong 200) e março de 2021 (\cong 120). Em nenhum flebotomíneo foi observado emissão de fluorescência quando exposto a luz UV. Sendo assim, concluímos que nenhum flebotomíneo foi recapturado (**Tabela 7**).

Tabela 7: Relação de flebotomíneos capturados, marcados, soltos e recapturados durante a análise de capacidade de voo no período de agosto e dezembro de 2020 e fevereiro e março de 2021.

	Período amostral			
	2020		2021	
	Agosto	Dezembro	Fevereiro	Março
# Flebotomíneos capturados, marcados e soltos	\cong 500 (Armadilha de Shannon)	\cong 630 (Armadilha de Shannon e HP)	\cong 200 (Armadilha de Shannon e HP)	\cong 120 (Armadilha luminosa HP)
# Flebotomíneos recapturados	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa

As tentativas de recaptura foram realizadas utilizando armadilhas luminosas do tipo HP (no galinheiro e na margem 2) e captura ativa com armadilha de Shannon (no galinheiro). Foi capturado um total de 1.027 espécimes nas tentativas de recaptura sendo as espécies mais abundantes *Ny. intermedia* (70,79%) e *Ny. neivai* (25,12%). Dentre as recapturas, foi observada maior abundância no ponto amostral do galinheiro (58,52%) que na margem (39,05%) (**Tabela 8**).

Tabela 8: Flebotomíneos capturados na tentativa de recaptura com armadilha luminosa HP em agosto e dezembro de 2020 e fevereiro e março de 2021 em relação aos locais de captura: Galinheiro, Margem esquerda e por armadilha shannon na área de estudo localizada em Lassance, MG.

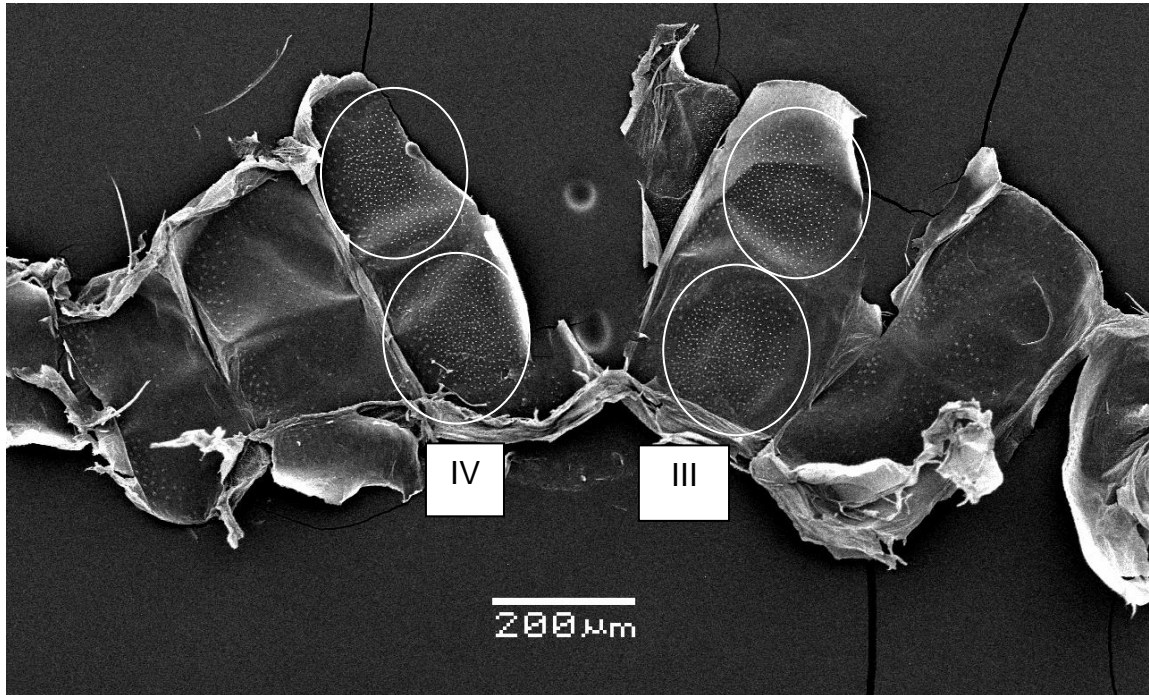
Ponto amostral / espécies de flebotomíneos	Galinheiro	Margem esquerda	Shannon	TOTAL
<i>Ny. intermedia</i>	514	198	15	727
<i>Ny. neivai</i>	59	195	4	258
<i>Ny. whitmani</i>	-	-	1	1
<i>Lu. longipalpis</i>	20	-	2	22
<i>Ev. sallesi</i>	-	1	1	2
<i>My. quinquefer</i>	1	-	-	1
<i>Mg. migonei</i>	1	-	-	1
<i>Ev. temithophila</i>	-	1	-	1
<i>Pa. limai</i>	3	-	-	3
Complexo cortelezzii	3	2	2	7
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	4	-	4
	601	401	25	
	(58,52%)	(39,05%)	(2,43%)	1027

Fonte: Dados da pesquisa

4.4 Estudo da morfologia da glândula de feromônio do complexo *Lu. longipalpis*

A metodologia desenvolvida para ter acesso às estruturas cuticulares internas do abdômen de flebotomíneos se mostrou eficaz permitindo a observação, na cutícula interna de *Lu. longipalpis*, de estruturas que são distribuídas na região correspondente às manchas encontradas externamente no 3° e/ou 4° segmento abdominal nesta espécie (**Figura 31**). A densidade dessas estruturas foi de aproximadamente 13/1000 μm^2 (\pm 1627 estruturas) em amostras de Campo Grande, aprox. 18/1000 μm^2 (\pm 1415 estruturas) em amostras de Jacobina e aprox. 18/1000 μm^2 (\pm 3469 estruturas) em amostras de Sobral.

Figura 31: MEV do interior do abdome de *Lu. longipalpis* de Campo Grande demonstrando distribuição das estruturas nas áreas correspondentes às manchas vistas, normalmente, do lado externo do inseto. Magnitude: x80. **Círculos traçados em branco** representam a localização das estruturas. Os números **III** e **IV** representam o tergito abdominal III e IV respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa

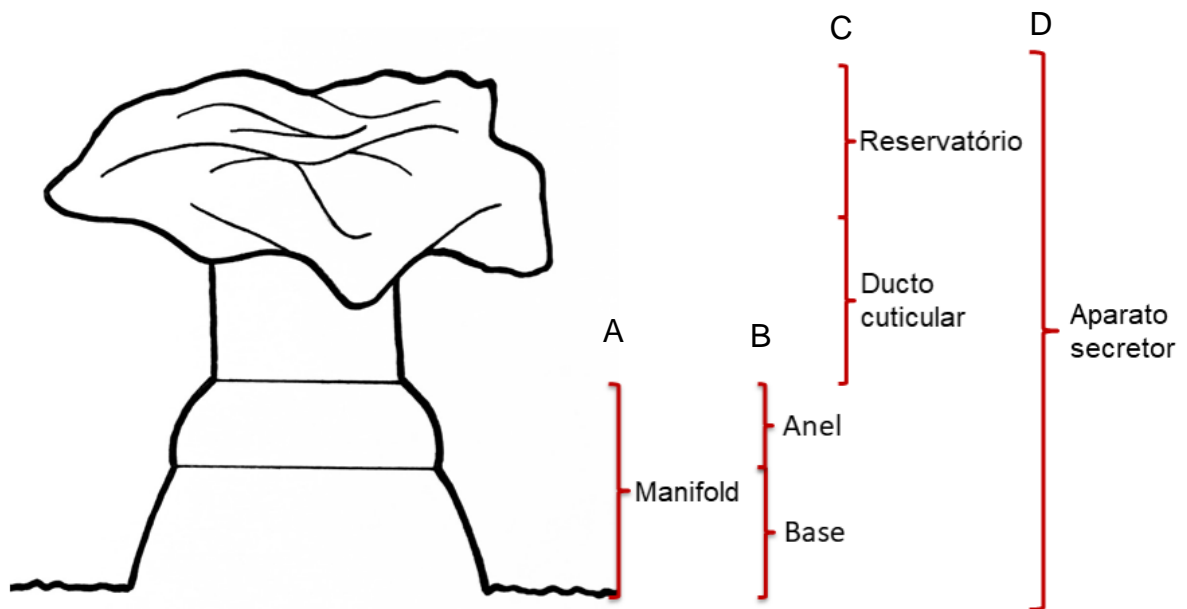
Ao observar as estruturas encontradas na cutícula interior do abdômen foi notado que a estrutura era composta por, basicamente, duas partes. A primeira estaria conectada com a parede cuticular interior ou poderia ser uma extensão do tergito e que foi denominado aqui de Manifold (**Figura 32A**). No meio civil, as estruturas responsáveis pela distribuição e controle da pressão dos sistemas a gás são chamadas de manifold, a partir desta função decidimos nomear a estrutura observada no presente estudo com o mesmo nome.

O manifold apresenta duas partes distintas: a base e o anel (**Figura 32B**). A segunda parte de toda a estrutura é o ducto cuticular (ducto quitinoso como descrito por Lane & Bernardes, 1990) que é conectado ao manifold e termina no reservatório secretor na parte distal (**Figura 32C**). O reservatório secretor seria como uma bolsa cuticular que pode assumir diferentes formatos. Tanto o ducto cuticular quanto o reservatório secretor são estruturas que já foram previamente observadas em estudos por microscopia eletrônica de transmissão (Boufana, 1990; Spiegel *et al.*,

2002) mas não foram relatados em estudos por MEV. Todas as partes juntas podem ser descritas como aparato secretor (**Figura 32 D**). Durante a preparação de algumas amostras, o complexo ducto + reservatório se soltou da estrutura do manifold dando a impressão de que o interior do manifold é oco.

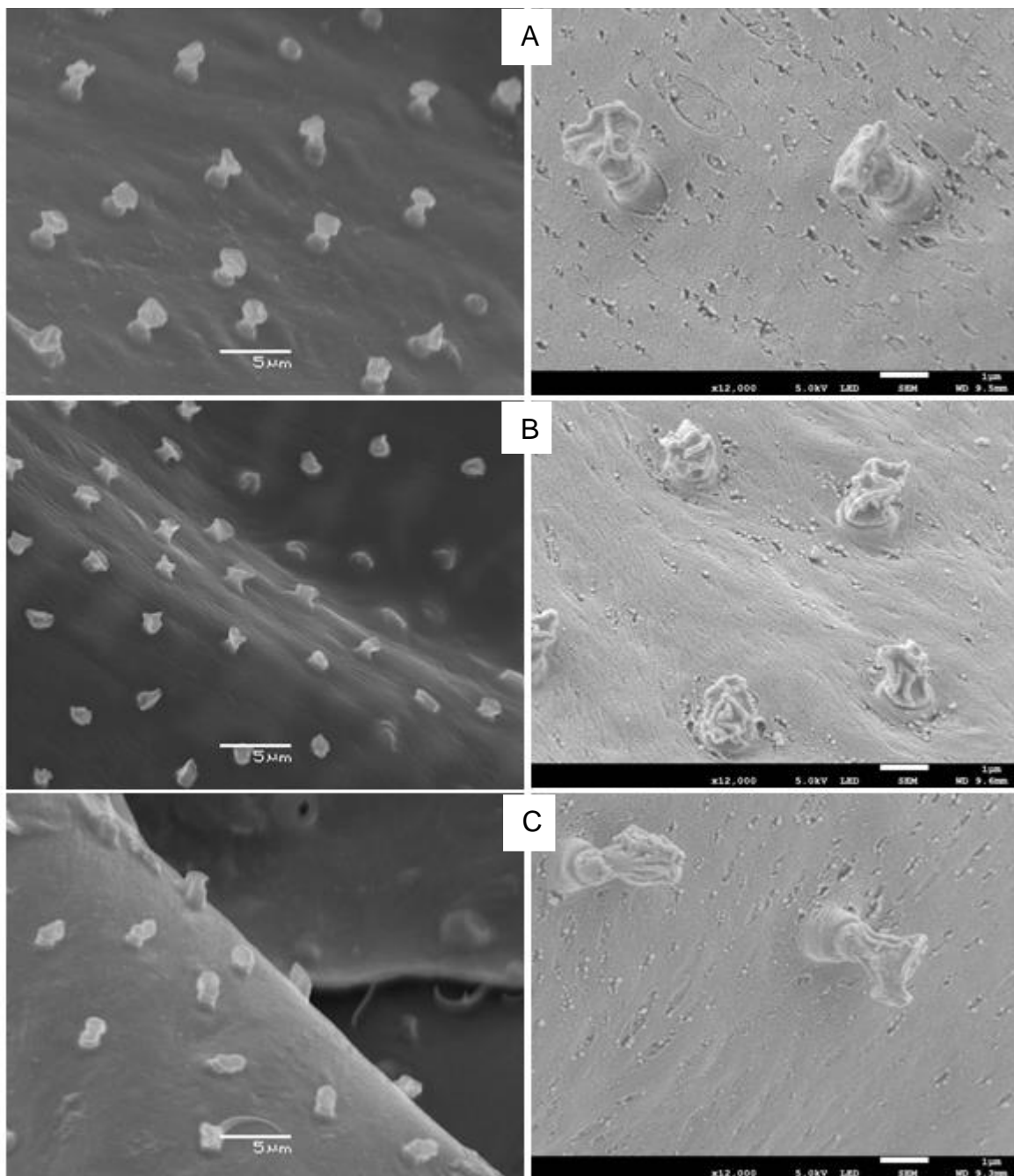
O aparato secretor dos membros de *Lu longipalpis* das três colônias da Universidade de Lancaster pode ser observado na **figura 33**.

Figura 32: Desenho esquemático dos componentes do aparato secretor de *Lutzomyia longipalpis* de Campo Grande, MG. **A)** Manifold; **B)** componentes do manifold, Base e Anel; **C)** Reservatório e ducto cuticular; **D)** Aparato secretor.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 33: Aparatos secretores observados na cutícula interna abdominal de 3 membros do complexo *Lu. longipalpis*. **A)** Campo Grande; **B)** Sobral; **C)** Jacobina. As imagens na coluna esquerda foram obtidas em um Jeol JSM-5610 com magnificação de 3.500x e as imagens da coluna direita foram obtidas em um Jeol JSM-7800F com magnificação de 12.000x.



Fonte: Dados da pesquisa

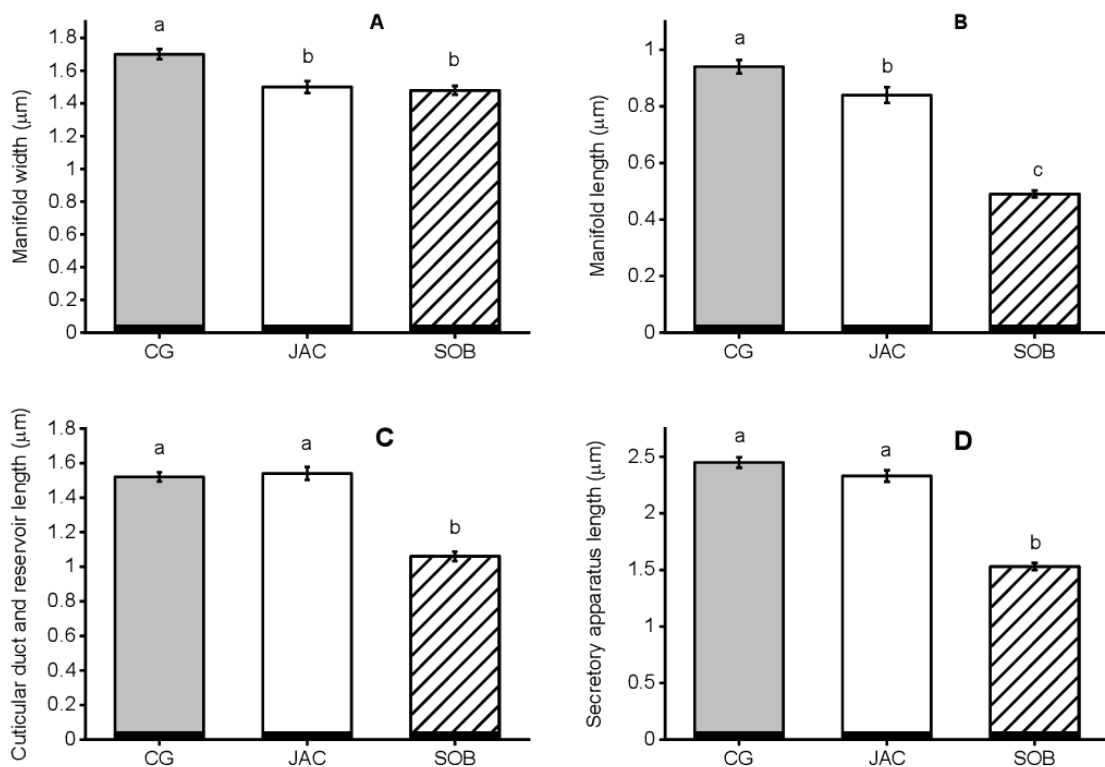
Houve significância na largura dos manifold entre os *Lu. longipalpis* das três colônias (df=147; F=15.17; $P<0.001$). O manifold de Campo Grande foi significativamente mais largo (mean±sem; $1.70\pm 0.031\mu\text{m}$) do que Jacobina ($1.50\pm 0.036\mu\text{m}$) e Sobral ($1.48\pm 0.027\mu\text{m}$), não houve diferença na largura do manifold entre Jacobina e Sobral (**Figura 34A**).

Observamos, também, alta diferença significativa no comprimento dos manifolds entre as três colônias de *Lu. longipalpis* analisadas (df=147; F=116.01; $P<0.001$). O manifold de Campo Grande ($0.94\pm 0.024\mu\text{m}$) foi significativamente mais longo do que o observado em Jacobina ($0.84\pm 0.028\mu\text{m}$) e, este, foi mais longo que o manifold observado nos indivíduos de Sobral ($0.49\pm 0.012\mu\text{m}$) (**Figura 34B**).

Houve diferença significativa, ainda, entre os indivíduos das três colônias analisadas em relação ao comprimento do ducto cuticular e o reservatório (df=147; F=75.55; $P=0.001$). As estruturas em questão de Campo Grande e Jacobina não apresentaram diferença entre si ($1.52\pm 0.027\mu\text{m}$ e $1.53\pm 0.038\mu\text{m}$ respectivamente) enquanto o ducto cuticular e o reservatório de Sobral foram significativamente menores ($1.06\pm 0.028\mu\text{m}$) (**Figura 34C**).

O comprimento de toda a estrutura, o aparato secretor, apresentou diferença significativa entre as amostras das três colônias de *Lu. longipalpis* (df=147; F=133.53; $P<0.001$). O aparato secretor de Campo Grande foi semelhante ao observado na população de Jacobina ($2.45\pm 0.046\mu\text{m}$ e $2.33\pm 0.051\mu\text{m}$ respectivamente). Entretanto, na população de Sobral, foi observado que o aparato secretor é significativamente menor que das demais localidades ($1.53\pm 0.032\mu\text{m}$) (**Figura 34D**).

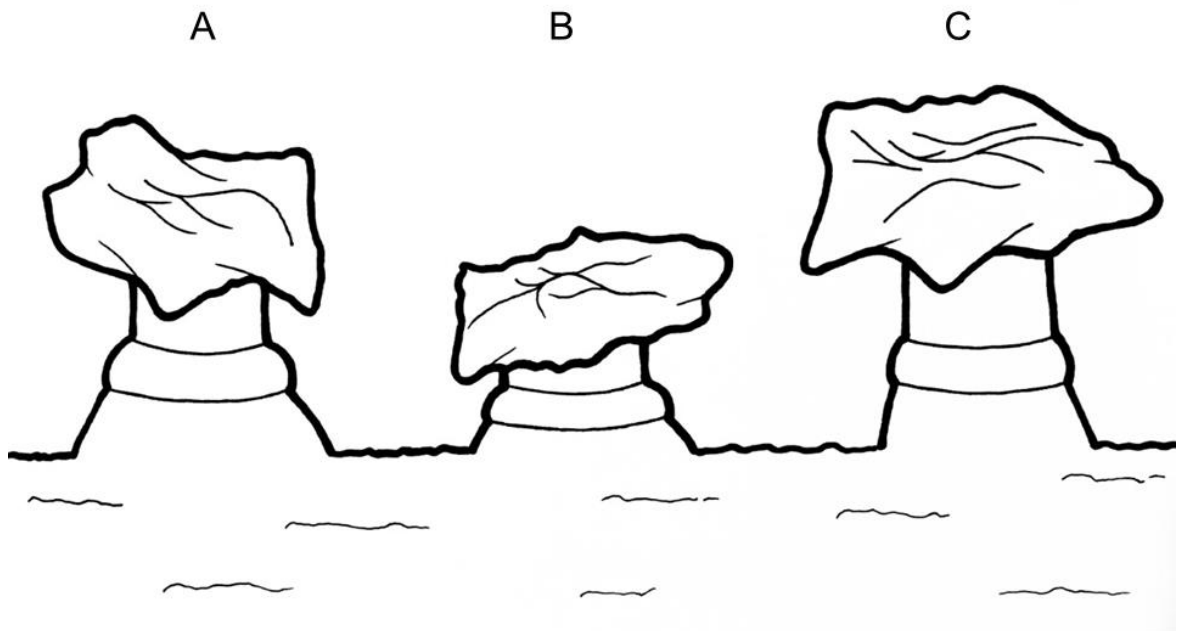
Figura 34: Dimensão dos componentes do aparato secretor analisado em 3 membros do complexo *Lu. longipalpis*. Tamanho médio das estruturas medidas (μm); **A**) Largura do manifold, **B**) altura do manifold, **C**) comprimento do reservatório e ducto cuticular, **D**) comprimento do aparato secretor. Campo Grande (CG), Jacobina (JAC) e Sobral (SOB). As barras de erro padrão são \pm erro padrão da média. O teste de Tukey foi utilizado para comparar os tamanhos das estruturas entre cada membro do complexo, as medidas com a mesma letra (a, b ou c) não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre si.



Fonte: Dados da pesquisa

As diferenças do formato e dimensão entre os aparatos secretores estão ilustradas na **Figura 35**. O manifold da população de Campo Grande (**Figura 35A**) foi mais largo e maior que o observado nos membros de Jacobina (**Figura 35C**). Ainda, o aparato secretor dos membros de Sobral (**Figura 35B**) foi o menor dos três.

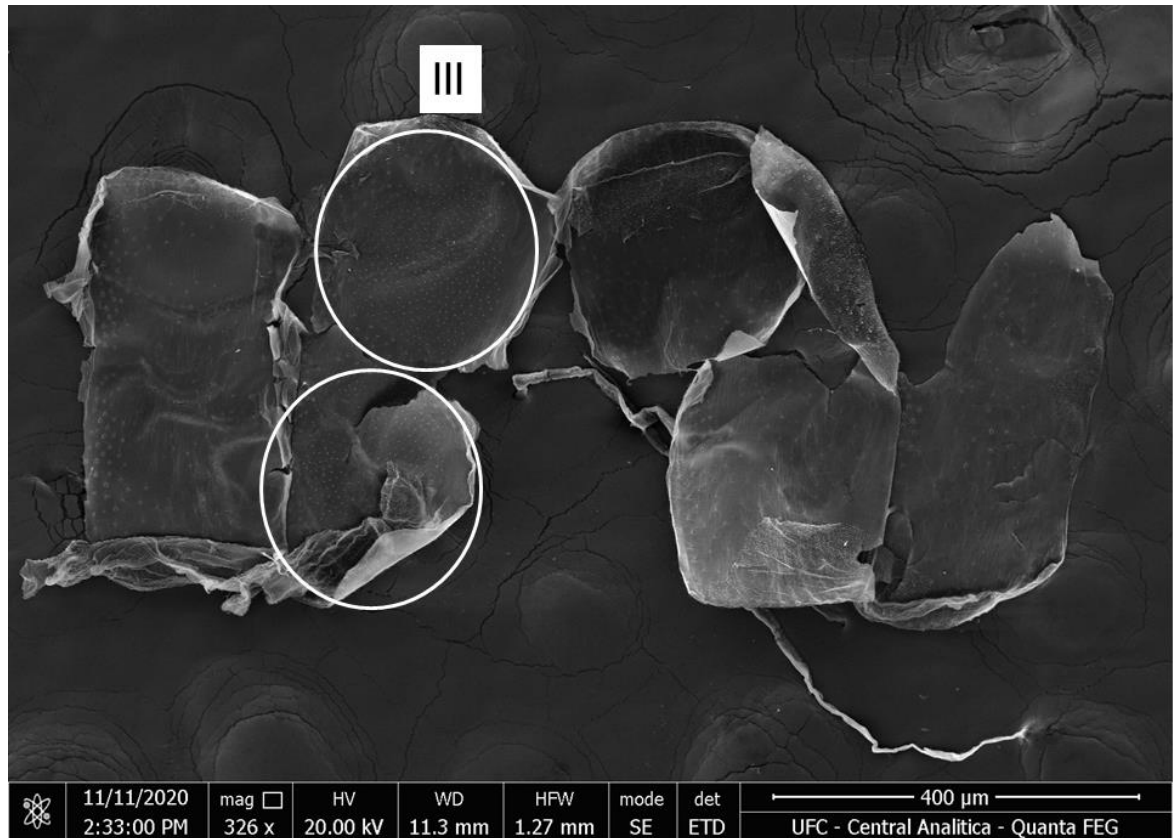
Figura 35: Desenho ilustrativo das diferenças morfológicas observadas no formato e tamanho do manifold nos três membros do complexo *Lu. longipalpis* de Campo Grande (**A**), Sobral (**B**) e Jacobina (**C**).



Fonte: Dados da pesquisa

Os indivíduos amostrados em Lassance foram classificados morfológicamente como 1S por apresentarem uma mancha nos segmentos abdominais (**Figura 36**).

Figura 36: MEV do interior dos seguimentos abdominais de *Lu. longipalpis* de Lassance, MG demonstrando distribuição das estruturas na área correspondente à mancha observada do lado externo do inseto. **Círculos traçados em branco** representam a localização das estruturas. O número **III** representa o tergito abdominal III. Magnitude de 326x.

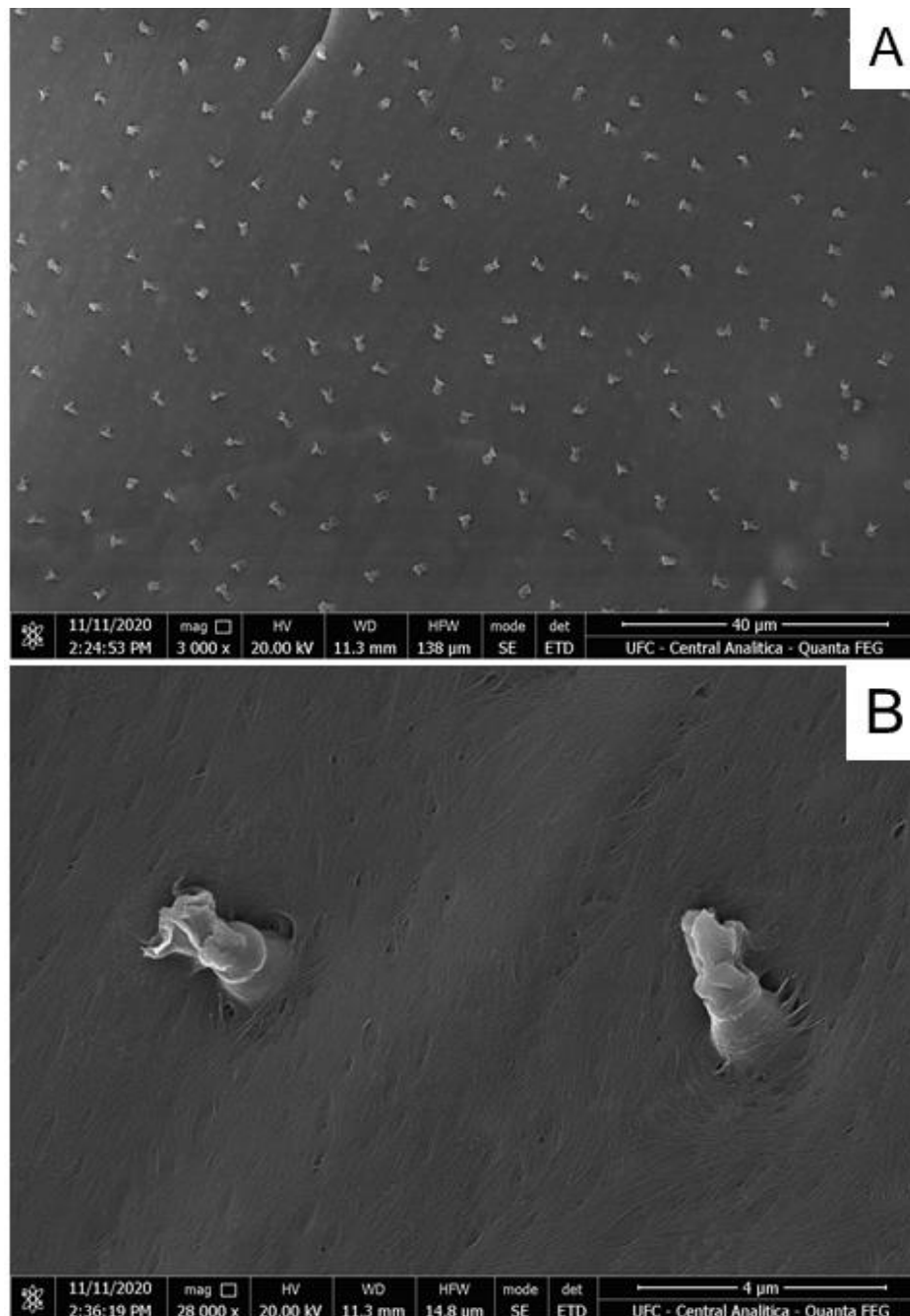


Fonte: Dados da pesquisa

A **figura 37** mostra distribuição e morfologia do aparato secretor nos indivíduos provenientes de Lassance. A distribuição dos aparatos secretores nos indivíduos do complexo *Lu. longipalpis* da população de Lassance, MG, foi semelhante à observada nas populações de Campo Grande, Jacobina e Sobral (**Figura 37A**) e, ainda, a morfologia do manifold e do aparato secretor se mostrou semelhante a observada nos indivíduos de Campo Grande e Jacobina (**Figura 37B**).

Devido a problemas relacionados ao cenário pandêmico do COVID-19, não foi possível realizar experimentos suficientes para replicar análises de medidas estruturais do aparato secretor da população do complexo *Lu. longipalpis* de Lassance, MG.

Figura 37: Análise de ultraestrutura por MEV (Quanta 450 FEG – FEI) em indivíduos do complexo *Lu. longipalpis* (1S) da população de Lassance, MG. **A)** Distribuição dos aparatos secretores no III tergito abdominal em magnificação de 3000X. **B)** Morfologia do aparato secretor na população de *Lu. longipalpis* de Lassance, MG em magnificação de 28000X.



Fonte: Dados da pesquisa

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudo da fauna de flebotomíneos no município de Lassance, MG.

A riqueza de espécies de flebotomíneos encontrada no presente estudo indica a adaptação destes insetos aos ambientes de diversos níveis de interferência antrópica. A área de estudo tem características de áreas peri urbanas e rural apresentando mais de 70% de arborização de suas vias e bioma de Cerrado (IBGE, 2019) e como demonstrados, todos os pontos amostrais apresentam fatores (área verde e animais) que favorecem a presença de flebotomíneos.

Ao observar a caracterização dos pontos amostrais no estudo da fauna de flebotomíneos na área urbana de Lassance, MG, todos os pontos amostrais apresentaram semelhanças com exceção do ponto 6, único com presença de grama, e o ponto 8, único com ausência de arbustos. Mesmo assim, acredita-se que estas variáveis não causem interferência, positiva ou negativa, na coleta de flebotomíneos. Todos os pontos amostrais apresentavam, pelo menos, um animal doméstico. A importância da presença de animais domésticos e dos níveis de urbanização de determinada área já são conhecidas na literatura por poder atuar na manutenção e urbanização de doenças como as leishmanioses em diversas regiões do Brasil (LUZ *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005; COSTA, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; LACERDA *et al.*, 2021).

A composição da fauna de flebotomíneos já fora analisada na região de Lassance mostrando fauna semelhante à encontrada no estudo (SARAIVA *et al.*, 2008 e 2012) com relato inédito das espécies *Ev. cortelezzii* e *Mi. oliveirai*. Entretanto nenhum dado sobre a fauna destes insetos fora apresentado na área urbana da cidade, onde é observada uma alta taxa de casos de leishmaniose canina e casos de leishmaniose em humanos (dados não publicados). Considerando que a cidade de Lassance apresenta perfil de área de transição entre área urbana e área rural, apresentando poucas características de desenvolvimento econômico em seu município, poucas vias pavimentadas, margeada por rica área verde do bioma cerrado e alta presença de animais domésticos e silvestres, a diversidade de flebotomíneos observada no presente trabalho corrobora com outros estudos em municípios com características semelhantes à Lassance localizados também na

região norte do estado de Minas Gerais (MONTEIRO *et al.*, 2005, REGO *et al.*, 2014; SANGUINETTE *et al.*, 2015).

Os dados amostrais revela a presença de espécies de importância médica como *Lu. longipalpis*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* (RANGEL *et al.* 1984; RYAN *et al.*, 1984; LAINSON *et al.*, 1985; GONTIJO *et al.* 2002; PITA-PEREIRA *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.* 2008; MARCONDES *et al.*, 2008; SARAIVA *et al.* 2009; PITA-PEREIRA *et al.*, 2009; MARGONARI *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.* 2010; REGO *et al.* 2015), o que causa preocupação pois surtos de leishmanioses podem surgir a partir desse cenário.

As espécies de maior abundância no estudo, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, apresentam importância médica na transmissão dos agentes etiológicos das formas visceral e tegumentar das leishmanioses e podem estar envolvidas na circulação do parasito na área de estudo. *Lu. longipalpis* foi a espécie observada com distribuição em todos os pontos amostrais e respondeu por mais da metade do total de flebotomíneos capturados e o ponto amostral de maior captura desta espécie foi o ponto 6. Esta considerável abundância amostral proveniente do mesmo ponto de coleta reflete na hipótese da existência de fatores locais, como presença de animais como fonte alimentar e micro-habitat ideal para cruzamento e desenvolvimento do inseto, que proporcionam tamanha quantidade de espécimes da espécie *Lu. longipalpis*. Entretanto, ao se comparar as características do ponto amostral 6 e sua localização na área de estudo em relação com os demais pontos de coleta não foi observada uma característica diferencial que justifique tamanha abundância.

A dominância da espécie *Lu. longipalpis* na área de estudo provavelmente explicaria o baixo valor do índice de uniformidade ($J' = 0,34$), uma vez que a grande abundância de apenas uma espécie tende a impactar a uniformidade das outras. A forte tendência de similaridade na comunidade de flebotomíneos estudada pode ser explicada devido a grande capacidade de dispersão desses insetos nos diferentes pontos amostrados da área urbana de Lassance, hipótese gerada diante da homogeneidade na diversidade das espécies de flebotomíneos e suas respectivas abundâncias observadas na área de estudo.

Durante o mês de outubro de 2018, o ponto 6 se encontrava em reforma e o galinheiro estava desmanchado, não havendo galinhas no local. Neste período, apenas um espécime *Lu. longipalpis* foi coletado no local mostrando assim a relação

amplificadora da presença de galinhas e a abundância na população de flebotomíneos como já relatado em outros trabalhos (FELICIANGELI 2004, OLIVEIRA *et al.* 2012, CASANOVA *et al.* 2013). Entretanto, outros três pontos (5, 7 e 8) apresentavam a presença de galinheiros e o número de flebotomíneos coletados foi muito inferior ao ponto 6. A ausência na uniformidade de distribuição de *Lu. longipalpis* já fora constatada por Fernández *et al.* (2013), apontando possível relação na incidência do vetor X áreas com coberturas vegetais. Entretanto, existe a possibilidade de haver maior abundância dos vetores em locais com alta presença de plantas e árvores e menor cobertura de solo por terra e/ou grama (SANTINI *et al.*, 2012). Logo, estudos de campo, visando a melhor interpretação dos locais de preferência dos flebotomíneos são necessários para melhor compreensão da ecologia destes organismos.

Uma vez que os dados climáticos utilizados no estudo foram obtidos pelo INMET e sua estação de captação destes dados mais próxima está localizada na cidade de Curvelo – MG, há aproximadamente 100 km de distância de Lassance – MG, optamos por não considerar análises estatísticas para comparar relação entre as variáveis climáticas e a abundância dos flebotomíneos capturados por ponto amostral a fim de evitar infidelidade nos resultados. Futuros estudos com objetivo de realizar tais comparações deveriam considerar obter os dados climáticos individualmente em cada ponto amostral a fim de gerar resultados fidedignos em relação aos locais de coleta dos insetos e possíveis micro-habitats dos mesmos.

Considerando as hipóteses de interferência positiva e/ou negativa das variáveis climáticas, notamos que os meses de maior sucesso amostral foram seguidos dos períodos de maiores níveis de umidade relativa demonstrando possível relação positiva entre umidade do ar X população de flebotomíneos. Ainda, após os períodos mais secos, observou-se queda no sucesso amostral do trabalho. A relação entre a umidade do ar X população de flebotomíneos também é discutida por Teodoro *et al* (1993) e Macedo *et al* (2008). Não foi observada relação entre a temperatura X população de flebotomíneos. Acredita-se que devido à baixa variação entre o período mais quente e o período mais frio ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) a mesma não exerceu interferência sobre o sucesso amostral dos insetos.

Devido à baixa disponibilidade de DNA durante o processo de extração individual e produto amplificado, apenas em uma amostra daquelas positivas para PCR ITS1 foi possível observar os padrões de restrição pela enzima *HaeIII*. Nesta

oportunidade, foi detectado DNA de *Le. infantum* em uma amostra da espécie *Lu. longipalpis*. Além desta, 8 amostras foram positivas na detecção do DNA de *Leishmania* pelo alvo ITS1. A maior abundância de amostras positivas provenientes do ponto amostral 6, provavelmente, é reflexo da maior abundância amostral no local. A infecção da espécie *Lu. longipalpis* por *Leishmania* já é bem esclarecida na literatura (RYAN *et al.*, 1984; LAINSON *et al.*, 1985). A relação entre a espécie *Ny. intermedia* e o parasito *Leishmania* já é, também, conhecida no meio científico sendo esta espécie envolvida na disseminação da leishmaniose tegumentar (RANGEL *et al.* 1984; GONTIJO *et al.* 2002; PITA-PEREIRA *et al.* 2005; SARAIVA *et al.* 2010; REGO *et al.*, 2015). O complexo cortelezzi também pode estar envolvido na veiculação do parasito *Le. infantum* e *Le. braziliensis*, entretanto são apenas investigações moleculares, com exceção do trabalho de Saraiva *et al.* 2009 também realizado em Lassance, e nenhuma comprovação destes como vetores foi realizada até o momento (CARVALHO *et al.*, 2008; SARAIVA *et al.*, 2009 e 2010). A taxa de infecção (2,10%) encontrada no presente estudo corrobora com os trabalhos de detecção molecular de *Leishmania* em flebotomíneos mencionados no trabalho de Tonelli *et al.* (2017).

Separamos a incidência das espécies *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* pelos pontos amostrais e distribuimos respectivamente no mapa de Lassance criando, assim, a distribuição das áreas de risco na área de estudo. A região do ponto amostral 6 representa a área de maior risco de transmissão das leishmanioses visto a abundância dos vetores *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, ainda, por ser o ponto amostral onde DNA de *Le. infantum* foi detectado. Nas demais regiões, as espécies em questão estão distribuídas em aproximadamente em 0,6% para *Lu. longipalpis* e 0,09% para *Ny. intermedia*.

O presente estudo representa o primeiro levantamento faunístico de flebotomíneos realizado no município de Lassance e os resultados obtidos demonstram a circulação do parasito *Le. infantum*, de espécies vetoras e, ainda, espécies com potencial papel na epidemiologia das leishmanioses em Lassance, Minas Gerais. A alta predominância da espécie *Lu. longipalpis* chama a atenção para alto risco de transmissão e disseminação de novos casos de leishmaniose visceral no local.

Ainda, o estudo demonstra a necessidade de mais estudos aprofundados em campo serem realizados a fim de elucidar questões pertinentes quanto a locais

de preferência e possíveis características no ambiente que interferem na abundância populacional de flebotomíneos.

5.2 Estudo da capacidade de voo dos flebotomíneos

Estudos com ênfase na capacidade de voo dos flebotomíneos são escassos na literatura. Algumas análises de captura, marcação e recaptura de dípteros em áreas endêmicas trazem noções sobre a dispersão destes insetos e a implicância epidemiológica da distribuição das espécies de importância médica e, logo, das leishmanioses (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1986; CASANOVA *et al.*, 2005). Nesta perspectiva, nosso estudo é pioneiro em analisar o voo dos flebotomíneos em seu habitat natural utilizando uma adaptação para armadilhas em uma barreira geográfica aquática que impede o pouso e descanso do voo destes insetos.

A metodologia aplicada em nosso estudo se mostrou útil para medir a capacidade de voo através de um rio como barreira geográfica. O suporte criado no estudo permite a utilização de armadilhas para flebotomíneos em meio aquático podendo ser utilizado, também, em trabalhos faunísticos de outros insetos voadores incluindo os de importância médica.

Em uma das capturas foi presenciada, alta densidade de material orgânico submerso nas águas do rio onde estas ancoraram em um dos suportes para armadilha luminosa fazendo com que toda a estrutura afundasse. Assim sendo, por mais que o suporte tenha sido útil, o mesmo é passível de adaptações de aprimoramento para futuros trabalhos semelhantes. Ainda em relação à metodologia de instalação das armadilhas na região central do rio, desconsideramos a hipótese de contaminação dos tubos de captura uma vez que as armadilhas e os tubos coletores foram utilizados de forma individual, mesma armadilha, para cada ponto amostral ao longo de todo o estudo e, ainda, estas eram transportadas desmontadas e desligadas até o ponto de captura e em horário de alta incidência solar, inviável para a presença de flebotomíneos.

Considerando a estimativa da velocidade de voo dos flebotomíneos proposta por Killick-Kendrick *et al.* (1986) (2,34 – 2,52 km/h), o sucesso de captura dos seis indivíduos na região central do rio das Velhas torna-se plausível ao observar que a

velocidade do vento na área de estudo durante o período de captura foi inferior aos valores mencionados por Killick-Kendrick *et al.* (1986). Na mesma perspectiva, ventos mais fortes que a velocidade de voo dos flebotomíneos relatada por estes autores poderiam atuar negativamente no voo dos flebotomíneos, impedindo estes de realizar voo, do que os auxiliar em sua dispersão. Durante o estudo a direção do vento atuou predominantemente na direção Noroeste, no sentido Margem 1 para a Margem 2, e, se houve interferência positiva do vento, acredita-se que os flebotomíneos capturados na região central do rio tenham origem da Margem 1. Acreditamos que na influência de fortes ventos os insetos não seriam capazes de serem carregados na direção das armadilhas luminosas e interromperem seu voo “forçado” a ponto de serem capturados.

Colacicco-Mayhugh *et al* (2011) também relatam maior sucesso amostral de flebotomíneos em períodos de baixos níveis de vento ao medir a interferência deste na captura dos insetos. O autor ainda ressalta que a alta iluminação lunar pode influenciar negativamente no sucesso amostral dos flebotomíneos e gerar uma falsa indicação de queda na atividade destes insetos. Durante as coletas não observamos possíveis interferências nas capturas em relação à incidência de luz lunar uma vez que os potes coletores eram encontrados com grande abundância de insetos diversos.

A porção do rio utilizada para análise de interceptação de voo dos flebotomíneos foi bastante útil apresentando todas as características necessárias já relatadas no planejamento do estudo incluindo fácil acesso para instalação e monitoramento das armadilhas. Saraiva *et al* (2008; 2012) realizaram capturas nas margens do rio das Velhas próximo à nossa área de estudo demonstrando, previamente, a abundância e diversidade de flebotomíneos no local. Corroborando com os dados de Saraiva e colaboradores (2008), as espécies de maior densidade foram *Ny. neivai* (63,43%) e *Ny. intermedia* (22,64%) sendo estas, também, mais abundantes na Margem 1 (57,83%) do que na Margem 2 (27,61%). A maior abundância de indivíduos observados provenientes da Margem 1 pode ser reflexo de um ecossistema mais rico desta margem ou área de menor interferência humana.

A metodologia de captura utilizando tubo falcon 50mL com mistura de álcool glicerinado (20%) acoplado à armadilha luminosa do tipo CDC mostrou-se útil para o estudo. Ainda, esta metodologia permite causar menos danos aos espécimes capturados mantendo intactas as estruturas morfológicas dos insetos sendo, assim,

útil para os estudos de fauna onde se dispensa o manuseio em excesso dos flebotomíneos.

Trabalhos de captura, marcação e recaptura são bastante laboriosos e demandam muita atenção além de cuidado no manuseio dos insetos a fim de evitar danos e estresse aos mesmos aumentando, assim, as chances de recaptura. No presente trabalho, não foi obtido sucesso amostral nas tentativas de recaptura dos flebotomíneos marcados e soltos. Acreditamos que a área submetida à análise de dispersão apresentou distância maior que a possível distância de dispersão que os flebotomíneos realizam em voo intermitente. Outro fator que possa ter resultado na não recaptura de flebotomíneos foi o número de insetos marcados e soltos. Um número grande de indivíduos marcados é necessário para soltura e ainda assim as taxas de recaptura são muito baixas como observado em Casanova *et al.*, (2005) onde estes obtiveram taxa de recaptura de 16,2% para 6.502 flebotomíneos marcados e soltos enquanto Morrison *et al* (1993) obtiveram taxa de recaptura de 5,5% para 3.747 flebotomíneos marcados e soltos. Acredita-se que muitos dos flebotomíneos submetidos à marcação e soltura não resistem ao estresse e morrem momentos após a soltura. Ainda, aqueles que sobrevivem podem encontrar fonte alimentar no local e, como discutido por Galati *et al.* (2009), criar competição entre a fonte alimentar e as armadilhas de recaptura, diminuindo as chances de sucesso desta.

Outras formas de marcação vêm sendo estudadas e podem diminuir o estresse submetido ao inseto do manuseio como, por exemplo, borrifar mistura de solução açucarada com corante em vegetação onde flebotomíneos se alimentam e realizar capturas destes. Em um estudo utilizando esta metodologia, Orshan *et al* (2016) apresentam algumas noções sobre a dispersão de flebotomíneos em áreas rurais, entretanto, a metodologia utilizada, borrifar solução açucarada com corante, torna-se inviável na nossa região visto a maior diversidade vegetal além da falta de conhecimentos sobre a preferência dos flebotomíneos em relação à flora.

Em seu estudo, Casanova *et al.*, (2005) mencionaram a capacidade de dispersão de *Ny. neivai* por longas distâncias em zona rural e, ainda, que as fêmeas apresentam distâncias mais longas percorridas. No presente estudo, espécimes de *Ny. neivai*, *Ny. intermedia* e *Ev. lenti*, foram capturadas na região central do rio a uma distância de 90 metros das margens sugerindo que estes flebotomíneos realizaram voo de forma contínua por esta distância. Ainda, existem hipóteses de

que fêmeas de flebotomíneos se deslocariam por maiores distâncias que machos quando em busca de alimentos, como revisado por Ready (2013), o que pode explicar a distância percorrida em voo contínuo nos flebotomíneos do presente estudo.

Excluindo *Ev. evandroi*, *Ev. teratodes*, *Ev. walkeri*, em todas as espécies de flebotomíneos mencionados no estudo, DNA do parasito *Leishmania* e/ou o parasito em si já foi detectado em estudos anteriores (RYAN *et al.*, 1984; LAINSON *et al.*, 1985; RANGEL *et al.*, 1984; GONTIJO *et al.*, 2002; PITA-PEREIRA *et al.*, 2005; MARCONDES *et al.*, 2009; SARAIVA *et al.*, 2009; MARGONARI *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2010; BRAZIL, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2015) demonstrando a importância das espécies observadas no presente estudo quanto à epidemiologia das leishmanioses. As espécies mais abundantes no estudo, *Ny. intermedia* (LUTZ & NEIVA 1912) e *Ny. neivai* (PINTO 1926), apresentam importância médica e estão envolvidas na transmissão de parasitos causando as formas cutâneas e muco cutânea da leishmaniose tegumentar nas regiões Sul e na América Central (ANDRADE FILHO *et al.* 2007; BRAZIL *et al.*, 2015) e podem ter relação com a circulação do parasito na área silvestre, na região estudada (SARAIVA *et al.*, 2012).

Por fim, nosso estudo evidencia ampla capacidade de voo dos flebotomíneos em seu hábitat natural com distância superior à encontrada anteriormente na literatura. Tal resultado amplia o conhecimento sobre a capacidade de dispersão destes insetos podendo inferir sobre a distribuição de espécies vetores e, logo, a distribuição das leishmanioses em área rural e/ou urbana. Ainda, o presente estudo enfatiza a importância de se realizar estudos de campo a fim de obter maior compreensão da ecologia de insetos transmissores de patógeno.

5.3. Estudo morfológico da glândula de feromônio do complexo *Lutzomyia longipalpis*

As estruturas disseminadoras de feromônio já foram observadas na cutícula de 350 espécies de flebotomíneos no Novo Mundo (*Lutzomyia* e *Brumptomyia* spp.) e em 5 espécies no Velho Mundo (*Sergentomyia*) (MATRIZ 1975). Estas estruturas

apresentam grande variedade morfológica incluindo estruturas com poros e crateras, poros com espinhos proeminentes, pápulas com ou sem espinhos e estruturas em formas de maçã (WARD *et al.*, 1993). O presente estudo revelou que além da estrutura visível na superfície externa do abdômen existe, também, uma estrutura na porção interior a qual apadrinhamos de Manifold, nome de um dispositivo utilizado para armazenar e/ou distribuir gases ou fluidos. O manifold, que não tinha sido previamente observado ou descrito, está associado com a distribuição do feromônio do aparato secretor para a superfície externa dos flebotomíneos.

O aparato secretor externo e outras estruturas cuticulares encontradas em flebotomíneos e outros insetos tem sido amplamente estudado através de MEV. As células associadas à produção de feromônio já foram examinadas através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em flebotomíneos (LANE & S. 1990; WARD *et al.* 1993; SPIEGEL *et al.* 2002, 2011; COSTA 2016) e em outros grupos de insetos produtores de feromônio como por exemplo Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e espécies de Trichoptera das famílias Rhyacophilidae e Limnephilidae (NOIROT & QUENNEDEY 1974; PERCY 1975; PERCY 1979; LENSKY *et al.* 1985; NOIROT & QUENNEDEY 1991; NARDI *et al.* 1996; PIERRE *et al.* 1996; RAINA *et al.* 2000; MELNITSKY & DEEV 2009).

A maioria destes estudos foi realizada com o objetivo de descrever o arranjo, localização e distribuição das células das glândulas secretoras de feromônio e não foram desenvolvidos para examinar os mecanismos de veiculação do feromônio entre o local de biossíntese e ponto de disseminação na superfície externa cuticular. Não temos conhecimento de estudos no meio científico que tenha examinado, via MEV, as estruturas internas associadas com a produção de feromônio em flebotomíneos ou em outros grupos de insetos.

Em relação às diferenças estruturais do feromônio sexual dos insetos utilizados no presente estudo, os membros do complexo *Lu. longipalpis* s.l. analisados mostraram diferenças relacionadas à biossíntese e liberação de seus feromônios (GONZALEZ *et al.*, 2017). Ainda, os resultados obtidos mostraram diferença significativa na morfologia do manifold entre as populações de Campo Grande, Sobral e Jacobina, o que é interessante uma vez que não existem relatos de diferença morfológica no tamanho e/ou forma das pápulas observadas na superfície externa do inseto. Entre as variedades e outros elementos do aparato secretor presente no Sobral, o membro do complexo é significativamente mais curto

do que Campo Grande ou Jacobina. A largura do manifold de *Lu. longipalpis* de Sobral não é significativamente diferente do observado para Jacobina, mas ambos são mais estreitos que o manifold de *Lu. longipalpis* de Campo Grande. Em geral sobre as diferenças morfológicas entre os manifolds, Campo Grande e Jacobina são bastante similares em tamanho e formato enquanto as estruturas de Sobral parecem ser menores e achatadas. O efeito dessas diferenças pode estar relacionado ao posicionamento das células secretoras que circundam o aparato secretor. Isto pode refletir na diferença no peso molecular (218 pb) do feromônio encontrado em Campo Grande e Jacobina comparado ao peso molecular encontrado no diterpeno da população de Sobral (272 pb). Nesta perspectiva, a distância para a maior molécula viajar da célula secretora para a superfície externa é menor do que para as outras duas moléculas mais leves e menos voláteis.

A densidade de manifold encontrada na cutícula interna dos espécimes de *Lu. longipalpis* de Sobral foi de 18/1000 μm^2 (aprox. 3469 no total) e corrobora com a densidade de pápulas observada na superfície externa de *Lu. longipalpis* de Sobral, (19/1000 μm^2) (SPIEGEL *et al.*, 2002). Isto não é diferente das estimativas de 14/1000 μm^2 pápulas pra mesma população de Sobral mencionada por Lane e Ward (1984). A densidade de manifold observada na população de Campo Grande, (S)-9-methylgermacrene-B, foi de aproximadamente 13/1000 μm^2 , valor entre 8/1000 μm^2 pápulas observadas por Lane & Ward (1984) em *Lu. longipalpis* coletados na Lapinha, MG, e 21/1000 μm^2 pápulas em *Lu. longipalpis* também coletados na Lapinha, MG (SPIEGEL *et al.*, 2002). O significado desta diferença não é certo, podendo estar relacionado às diferenças entre a população de Campo Grande e a população da Lapinha, o que é semelhante ao observado entre Sobral (S)-9-methylgermacrene-B e a população da Lapinha onde na primeira foi observada maior produção de feromônio que nos indivíduos da Lapinha (HAMILTON *et al.*, 2005) e em análise de componentes principais de SNPs em 245 genes quimiorreceptores (HICKNER *et al.*, 2021).

Esta é a primeira vez em que o manifold é visualizado em qualquer grupo de inseto e sua função ainda não é clara. É possível que o manifold seja encontrado apenas em flebotomíneos, mas também é possível que ocorra em outras ordens de insetos e, ainda, o manifold poderia ser simplesmente um dispositivo para garantir o transporte de forma segura do feromônio sexual das células secretoras para o meio externo da cutícula.

A robustez estrutural do manifold poderia sugerir que este foi desenvolvido para minimizar potencial vazamento do potencial terpeno tóxico (Agus 2021) do feromônio para o abdômen. Os flebotomíneos machos lutam com outros machos para defender o território e, nessas batalhas agressivas (JARVIS e RUTLEDGE 1992; SOARES & TURCO 2003), os machos podem arriscar desalojar poros desprotegidos que carregam feromônios tóxicos. No entanto, sem uma visão clara do interior do manifold, é incerto se funcionalidade adicional pode existir como, por exemplo, uma válvula passiva ou controlável ou um reservatório de feromônio ou outro mecanismo para regular o fluxo de feromônio para ajudar a fornecer um suprimento de feromônio quando necessário (GONZALEZ *et al.*, 2017). Futuramente será possível obter uma noção clara do interior destas estruturas através de metodologias microscópicas mais refinadas como, por exemplo, Synchrotron Radiation Microtomography (ENRIQUEZ *et al.*, 2021).

Contar as pápulas a partir da cutícula externa é bastante laborioso uma vez que a presença das macrotríquias dificulta a visualização das estruturas (LANE & WARD, 1984; SPIEGEL *et al.*, 2002). Observar a localização, distribuição e densidade dos manifolds na cutícula interna foi um meio conveniente para analisar toda a cutícula interna do abdômen de espécies de flebotomíneos. Mais estudos devem ser conduzidos nesta perspectiva para comparar a densidade destas estruturas em diferentes membros do complexo *Lu. longipalpis* de diferentes regiões do Brasil assim como também em outras espécies do Novo e Velho mundo envolvidas na produção de feromônio.

Esses resultados podem contribuir para a discussão da natureza do complexo de espécies *Lu. longipalpis*, pois mostram que existem diferenças morfológicas claras entre 3 dos membros do complexo. Essas estruturas também podem ser ferramentas taxonômicas úteis de forma mais geral dentro do grupo de flebotomíneos envolvidos na produção de feromônio. O estudo também mostra que, além da ampla distribuição, essas estruturas internas provavelmente estão fortemente associadas à produção ativa de feromônios. A presença do coletor e de seu aparato final associado é consideravelmente mais fácil de localizar do que estruturas externas isoladas ocultas como em *Lu. renei* (SPIEGEL *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho podemos concluir que:

1) A fauna de flebotomíneos no município do Lassance, MG foi mensurada e é em sua diversidade são observadas espécies de importância médica.

1.1) Foi observada presença de flebotomíneos em todo o município de Lassance – MG.

1.2) A espécie *Lu. longipalpis* representou abundância maior que a 50% do total amostrado concentrando-se no ponto amostral 6 e os fatores que proporcionam esta dominância ainda são desconhecidos.

1.3) De acordo com o mapa de área de risco gerado no estudo, a região da casa 06 apresenta maior risco devido à abundância de *Lu. longipalpis* e da detecção de DNA de *Le. infantum* na espécie no mesmo local.

2) A análise de capacidade de voo de flebotomíneos mostrou que estes insetos são capazes de se dispersar em voo contínuo por 90 metros de distância.

3) Estruturas da cutícula interna abdominal de *Lu. longipalpis*, relacionadas ao armazenamento e liberação de feromônio, foram observadas pela primeira vez no meio científico e denominadas Manifold.

3.1) Os manifolds, mostraram diferença morfológica entre três grupos do complexo *Lu. longipalpis* e podem auxiliar como ferramenta taxonômica para o desmembramento de espécies dentro do complexo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, H. H. **Chapter 4 - Terpene toxicity and oxidative stress**. In.: V. B. Patel and V. R. Toxicology. Preedy, Academic Press: p. 33-42, 2021.

AKHOUNDI, M *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.3, p. e0004349, 2016.

ALBUQUERQUE, PLMM *et al.* Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v.26, n.4, p. 330–3, 2009.

ALENCAR, J. E. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará Méd**, v.5, p. 86-102, 1983.

ALEXANDER J B. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombia coffee plantation. **J. Med. Entomol**, v.24, p. 552–558, 1987.

ALEXANDER, JB; YOUNG, DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.87, p. 397-403, 1992.

ALVES, V. R.; FREITAS, R. A. D.; BARRETT, T. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p. 251-253, 2008.

ANDRADE FILHO, JD; GALATI, EAB; FALCÃO, AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n.4, p.481-487, 2007.

ARAKI, AS *et al.* Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, p. e365, 2009.

ASHFORD, RW. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.523-523, 1996.

ASHFORD RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, p.1269-1281, 2000.

BELL, MJ *et al.* Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to synthetic sex-aggregation pheromone: Effect of release rate and proximity of adjacent pheromone sources. **PLoS Negl Trop Dis**, v.12, n.12, 2018.

BOUFANA, B. **The tergal pheromone gland and antennal sensilla of the sandfly *Lutzomyia longipalpis***: University of Liverpool, PHD Thesis; 1990.

BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.97, p. 291–296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1.ed., v.5. Reimpr. Brasília, 2014.

BRAY, DP *et al.* Synthetic Sex Pheromone in a Long-Lasting Lure Attracts the Visceral Leishmaniasis Vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 Weeks in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.3, p. e2723, 2014.

BRAZIL, RP; BRAZIL, BG. **Biologia de Flebotomíneos Neotropicais**. In: RANGEL EF; LAINSON, R. Flebotomíneos no Brasil. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, p.257-274, 2003.

BRAZIL, RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban área. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.46, n.3, p. 263-264, 2013.

BRAZIL, RP; RODRIGUES, AAF; ANDRADE FILHO, JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. **Entomol Ornithol Herpetol**, v.4, p.144, 2015.

CABRERA, MAA *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.45, p. 79-83, 2003.

CAMPINO, L. *et al.* Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. **Trop Med Int Health**, V.11, p.1708-1714, 2006.

CARVALHO, GML *et al.* Description of *Evandromyia spelunca*, a new phlebotomine species of the *cortelezzii* complex, from a cave in Minas Gerais State, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Parasit Vectors**, v.4, p.158, 2011.

CARAVALHO, GML *et al.* Hourly Activity and Natural Infection of Sandflies (Diptera: Psychodidae) Captured from the Aphotic Zone of a Cave, Minas Gerais State, Brazil. **Plos One**, v.7, p.e52254, 2012.

CARAVALHO, GML *et al.* Ecological Aspects of Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) from a Cave of the Speleological Province of Bambuí, Brazil. **Plos One**, v.8, p.e77158, 2013.

CASANOVA, C; COSTA, AIP; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.719–72, 2005.

CASANOVA, CD; NATAL, D; SANTOS, FAM. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. **J Med Entomol**, v.46, p.42-50, 2009.

CASANOVA, C *et al.* Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, V.7, p.e2443, 2013.

CASANOVA, C *et al.* Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo State, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, p.e0003620, 2015.

Center of Disease Control and Prevention CDC. **Parasites – Leishmaniasis: Biology**. <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> . Acesso em: Junho de 2020.

CHAGAS, C. Descoberta do *Tripanozoma cruzi* e verificação da Tripanozomíase Americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.15, p. 67-76, 1922.

CHANIOTIS, BN *et al.* Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. **J. Med. Entomol**, v.2, p.369–375, 1974.

CHAVES, L. F. *et al.* Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.2, p.e176, 2008.

COLACICCO-MAYHUGH, M.G *et al.* Impact of Phlebotomine Sand Flies on United States Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 5. Impact of Weather on Sand Fly Activity. **J. Med. Entomol.**, v. 48, n.3, p.538–545, 2011.

COPELAND, NK; ARONSON, NE. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Curr Opin Infect Dis**, v.28, p.426–437, 2015.

COSTA, CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.24, n.12, p.2959-2964, 2008.

COSTA, PL. **Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil**. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife. Recife, Fundação Oswaldo Cruz. PhD Thesis, 2016.

COTA, GF *et al.* The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v.11, n.2, p.e0149697, 2016.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.101, p.117-118, 2006.

DE SOUZA, RL., *et al.* Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct ecoepidemiologic features. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.76, n.3, p.559-565, 2006.

DEANE, LM; DEANE, MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**, v.45, p.419-421, 1954.

DEANE, LM; DEANE, MP. **Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission.** **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.4, p.198-212, 1962.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**, v.5, p.276, 2012.

DYE, C.; DAVUES, C. R.; LAINSON, R. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. **Anim. Behav.**, v.42, p.183-192, 1991.

EL TAI, NO *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**. v.94, p.1–5, 2000.

ENRIQUEZ, J. J. *et al.* The Methodology to produce *Rhodnius prolixus* head structures made by 3D printing using Synchrotron Radiation Microtomography. **J. Instrum**, v.16, n.2, p.P02014-P02014, 2021.

FELICIANGELI, MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Med Vet Entomol**, v.18, p.71-80, 2004.

FERNÁNDEZ, MS *et al.* *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. **Acta Trop**, v. 114, p. 81-87, 2010.

FERNÁNDEZ, M. S. *et al.* Mudanças espaciais e temporais na abundância de *Lutzomyia longipalpis*, um vetor de *Leishmania infantum* em uma área urbana no nordeste da Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 817-824, 2013.

FERREIRA, E. C *et al.* Leishmanioses do Novo Mundo – Estudo de hospedeiros não humanos e sua importância para a compreensão da ecoepidemiologia da doença. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 9-27, 2012.

FORATTINI, O.P. *et al.* Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde públ., S. Paulo**, v. 10, p. 31-43, 1976.

FREIRE-MAIA N. **Teoria da Evolução: De Darwin à teoria sintética**. 2rd ed., Itatiaia. Belo Horizonte, 1988.

GALATI EAB. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R, editores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. P. 23–51, 2003.

GALATI, EAB *et al.* Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1148–1148, 2009.

GALATI E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. In: Rangel E., Shaw J. (eds). **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham. 2018.

GONTIJO, C. M. F., *et al.* Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop**, v. 81, p. 143-150, 2002.

GONTIJO, B.; de CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, CMF; MELO MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZALEZ, M. A *et al.* A temporal comparison of sex-aggregation pheromone gland content and dynamics of release in three members of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) species complex. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 12, p. e0006071, 2017.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **J Parasitol**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med, Hyg**, v. 41, p. 687-725, 1989.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

HAMILTON JGC; DAWSON, GW; PICKETT, JA. 9-Methylgermacrene-B; Proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. **J Chem Ecol**, v. 22, p. 1477–91, 1996a.

HAMILTON, JG *et al.* Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous

leishmaniasis in Honduras and Cost Rica. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 90, p. 533–41, 1996b.

HAMILTON, JGC *et al.* 3-Methyl- α -himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. **Chem Commun**, v. 4, p. 355–6, 1999a.

HAMILTON, JGC *et al.* 9-Methylgermacrene-B is confirmed as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as S. **Chem Commun**. v. 23, p. 2335-6, 1999b.

HAMILTON JGC, BRAZIL RP, MAINGON R. A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. **J Med Entomol**, v. 41, p. 1021–6, 2004.

HAMILTON, JGC *et al.* Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. **Med Vet Entomol**, v. 19, p. 480–8, 2005.

HICKNER, P. V. *et al.* Molecular signatures of sexual communication in the phlebotomine sand flies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 12, p. e0008967, 2021.

HIDE, M.; *et al.* **Understanding human leishmaniasis: the need for an integrated approach.** In: M. Tibayrenc (ed.), *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. John Wiley & Sons, 2007. p. 87-123

HOTEZ PJ. Global urbanization and the neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005308, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2019. < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/lassance.html>> Acessado em 12/05/2020.

JARVIS, E. K. AND L. C. RUTLEDGE. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 29, n. 2, p. 171-177, 1992.

JUSTINIANO, SCB *et al.* Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. **Braz. J. Biol.**, v. 64, n. 2, p. 227-235, 2004.

KARLSON, P; LUSCHER, M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v. 183, p. 55–6, 1959.

KILLICK–KENDRICK, R *et al.* Ecology of leishmaniasis in the South of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of the visceral leish maniasis in the Cevennes. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 59, p. 555-572, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v.78, p. 747-755, 1985.

KILLICK-KENDRICK, R *et al.* Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 80, p. 138-142, 1986.

LACERDA, AFA *et al.* Clinical, epidemiological and transmission cycle aspects of leishmaniasis urbanization in Barreiras, Bahia, Brazil. **Spat. Spatio-temporal Epidemiol**, v. 36, n. 100395, p. 1877-5845, 2021.

LAINSON, R.; READY, PD.; SHAW, J.J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Science**. v. 206, n. 1164, p. 307-318, 1979a.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis.** In **Biology of the Kinetoplastida.** W. H. R. Lumsden and D. A. Evans (Editors). London and New York: Academic Press. v. 2, p. 1-116, 1979b.

LAINSON, R, *et al.* Leishmaniasis in Brazil. XXI. visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 79, n. 2, p. 223–226, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution.** In W. Peters and Killick-Kendrick (ED) *The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology.* Academic Press, London, United Kingdom, v. 1, 1987.

LANE, RP; WARD RD. The morphology and possible function of abdominal patches in males of 2 forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Phlebotominae). **Cah ORSTOM (Office la Rech Sci Tech Outre-Mer) Ser Entomol Medicale Parasitol**, v. 22 p. 245–9, 1984.

LANE, RP; BERNARDES, D DE S. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 84, n. 1, p. 53-61, 1990.

LAWYER, P.G. AND P.V. PERKINS. **Leishmaniasis and trypanosomiasis.** In: B.F. Eldridge and J.D. Edman (eds). *Medical Entomology.* Kluwer, The Netherlands. p. 231-298, 2004.

LENSKY, Y *et al.* The fine structure of the tarsal glands of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera). **Cell and Tissue Research**, v. 240, n. 1, p. 153-158, 1985.

LINDOSO, JAL *et al.* **Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges.** **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v.8, p. 147–156, 2016.

LUTZ, A; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do genero *Phlebotomus* existentes no Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, 12p, 1912.

LUZ, ZMP *et al.* A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 34, p. 249-254, 2001.

MACEDO, ITF *et al.* Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18, n. 2, p. 67-74, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. **Rev Bras Mal Doenças Trop**. v. 21, n. 3, p. 26, 1969.

MARCONDES, CB *et al.* Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (Viannia) spp. in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 103, n. 11, p. 1093–1097, 2009.

MARGONARI, C., *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.

MARGONARI, C., *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **J. Med. Entomol**, v. 47, n. 6, p. 1212-1219, 2010.

MARZOCHI, MCA; MARSDEN, PP. Ecologia e controle de vetores - Leishmanioses. In: *Encontro Nacional sobre Saude e Meio Ambiente* (Fiocruz), Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 31-36, 1991

MARZOCHI, MCA; MARZOCHI, KBF; CARVALHO, RW. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol Today**, v. 10, p. 34-37, 1994.

MELNITSKY, S. I. ; R. V. DEEV. The fine structure of sternal pheromone glands in the two caddisfly species from the Rhyacophilidae and Limnephilidae families (Insecta: Trichoptera). **Russ. Entomol. J**, v. 18, p. 10, 2009.

MIGONE, L. E., Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bull Soc Path Exo.**, v. 6, p. 118-20, 1913.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SMS). **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde; p. 190, 2017.

MONTEIRO, EM *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MORRISON, AC *et al.* Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol**, v. 30, p. 427–435, 1993.

NARDI, J. B.; DOWD, P. F.; BARTELT, R. J.. Fine structure of cells specialized for secretion of aggregation pheromone in a nitidulid beetle *Carpophilus freemani* (coleoptera: Nitidulidae). **Tissue Cell**, v. 28, n. 1, p. 43-52, 1996.

NOIROT, C. ; QUENNEDEY, A. Fine Structure of Insect Epidermal Glands. **Annu. Rev. Entomol**, 19, n. 1, p. 61-80, 1974.

NOIROT, C. AND A. QUENNEDEY. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. **Ann. Soc. Entomol. Fr**, v. 27, n. 6, 1991.

OLIVEIRA, AG *et al.* Ecological aspects of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **J Med Entomol**, v. 49, p. 43-50, 2012.

OLIVEIRA, EF *et al.* Behavioral Aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. **J. Med. Entomol**, v. 50, p. 277-284, 2013.

ORSHAN, L. *et al.* Distribution and Dispersal of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Focus, the Northern Negev, Israel. **PLoS Neglected Trop Dis**, v. 10, n. 7, p. e0004819, 2016.

PAIVA, BR *et al.* Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Trop**, v. 115, n. 1–2, p. 126-130, 2010.

PERCY, J. E. Development and ultrastructure of cells of the sex pheromone gland in the white-marked tussock moth, *Orygia leucostigma* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Lymantriidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.4, n. 6, p. 567-579, 1975.

PERCY, J. Development and ultrastructure of sex-pheromone gland cells in females of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Can. J. Zool**, v. 57, n. 1, p. 16, 1979.

PEREIRA, AAS *et al.* Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS ONE** v. 12, n. 11, p. e0187704, 2017.

PETERSON, AT; SHAW, JJ. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **Int J Parasitol**, v. 33, p. 919-931, 2003.

PIERRE, D *et al.* Location and ultrastructure of sex pheromone glands in female *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera : Bruchidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 25, n. 4, p. 391-404, 1996.

PITA-PEREIRA, D *et al.* 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 hybridisation assay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.99, p. 905-913, 2005.

PHILLIPS, A *et al.* Chemical analysis of compounds extracted from the tergal “spots” of *Lutzomyia longipalpis* from Brazil. **Acta Trop**, v. 43, p. 271–6, 1986.

QUARESMA, PF *et al.* **Wild, synantropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.** **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 105, n. 10, p. 579–585, 2011.

QUARESMA, PF *et al.* Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 480-485, 2012.

QUATE, LW. *Phlebotomus* sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera, Psychodidae). **J. Med. Entomol**, v. 1, p. 213–268, 1964.

RAINA, A. K *et al.* Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. **Arthropod Struct Dev**, v. 29, n. 4, p. 343-353, 2000.

RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA, E.M.; TRAUB-CSEKÖ, Y.M. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationship are not necessarily easy. **Parasitology open**, v. 4, p. 195-204, 2010.

RANGEL, EF *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 395-396, 1984.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 937-954, 2009.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948 - 2952, 2008.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect dis**, v. 7, n.9, p. 581-96, 2007.

REGO, F. D. *et al.* Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera:Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Parasites Vectors**, v. 7, p. 220, 2014.

RÊGO, F. D. *et al.* Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniasis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122038, 2015.

REGO, F. D.; PINTO R. P. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. **An Acad Bras Cienc**, v. 93, n. 3, p. e20200254, 2021.

ROQUE, ALR; JANSEN, AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 3, p. 251–262, 2014.

RYAN, L. *et al.* Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 78, p. 547-548, 1984.

SALOMÓN, OD *et al.* *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 7, p. 831-846, 2015.

SANGUINETTE, CC *et al.* Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 428, 2015.

SANTINI, M. S. *et al.* Abundância de *Lutzomyia longipalpis* na cidade de Posadas, nordeste da Argentina: variações em diferentes escalas espaciais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 767-771, 2012.

SANTOS, GPL *et al.* Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District , Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, p. 161-6, 2005.

SARAIVA, L *et al.* Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of Velhas river in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 843-846, 2008.

SARAIVA, L *et al.* Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J Med Entomol**, v. 46, p. 1159-1163, 2009.

SARAIVA, L *et al.* Biogeographical aspects of the occurrence of *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae) in a simpatric area of the Brazilian Savannah. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 867-872, 2012.

SCARPASSA, VM; ALENCAR, RB. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37341, 2012.

SCHONIAN, G *et al.* **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** *Diagn Microbiol Infect Dis*. v. 47, p. 349–358, 2003.

SERENO, D. *Leishmania* (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. **New microbes and new infections**. v. 30, p. 100540, 2019.

SERIDI, N. *et al.*, Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. **Microbes Infect**, v. 10, n.12-13, p. 1309-1315, 2008a.

SERIDI, N. *et al.*, Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 6, p. 556-563, 2008b.

SHERLOCK, I. A. *et al.* Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 515, 1984.

SHERLOCK, I. A. **Importância Médico-Veterinária**. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R.(Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 15-22, 2003.

SHIMABUKURO, P. H. F. *et al.* Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, p. 67, 2017.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An. Acad. Bras**, v. 75, p. 301-330, 2003.

SOARES, R. P. *et al.* Differential midgut attachment of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, n. 439174, p. 7, 2010.

SOUZA, NA; BRAZIL, RP; ARAKI, AS. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 161-174, 2017.

SPIEGEL, C.N.; BRAZIL, R.P.; SOARES, M.J. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). **Arthropod Struct Dev**, v. 30, n. 3, p. 219-27, 2002.

SPIEGEL, C. N. *et al.* Pheromone Gland Development and Pheromone Production in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **J. Med. Entomol**, v. 48, n. 3, p. 489-495, 2011.

SPIEGEL, CN *et al.* The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 580, 2016.

STEUBER, S; ABDEL-RADY, A; CLAUSEN, P-H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitol. Res**, v. 97, p. 247–254, 2005.

TEODORO, U *et al.* Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná - Brasil: Variação Sazonal e Atividade Noturna. **Rev. Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 190-4, 1993.

TONELLI GB, *et al.* Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178628, 2017a.

TONELLI GB, *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0190315, 2017b.

TORRES-GUERRERO, E, *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TRAVI, B. L. *et al.* Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. **J Med Entomol**, v. 39, n. 3, p. 451-456, 2002.

TRUPPEL, J. H. *et al.* Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.

WARD, R. D. *et al.* Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera: Psychodidae). **Bull. Entomol. Res**, v. 83, n. 3, p. 437-445, 1993.

WATTS, P.C. *et al.* Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, p. 734–43, 2005.



WILLIAMS P. Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 177-183, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases/Leishmaniasis**. p. 91-96, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). [online]. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Genebra 2021.

8. ANEXO

Anexo 1 - Licença permanente para coleta de material zoológico nº 15237-2 do Ministério do Meio Ambiente (MMA).

 Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO		
Licença permanente para coleta de material zoológico		
Número: 15237-2	Data da Emissão: 29/11/2011 17:39	
Dados do titular		
Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01	
Observações e ressalvas		
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.	
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.	
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;	
4	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.	
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.	
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.	
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)	
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.	
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.	
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.	
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.	
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.	
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .	
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.	
Táxons autorizados		
#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Psychodidae
2		
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção
2	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	coleção
<p>Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).</p>		
Código de autenticação: 36646273		Página 1/2
		



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-2	Data da Emissão: 29/11/2011 17:39
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36646273



Página 2/2