

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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE
PAINS, CENTRO OESTE MINEIRO**

por

Danyele Franca da Silva

**Belo Horizonte
2019**

TESE/DISSERTAÇÃO MCS-IRR

D.F.SILVA

2019

DANYELE FRANCA DA SILVA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE
PAINS, CENTRO OESTE MINEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Coorientação: Dr. Gustavo Mayr de Lima Carvalho

Belo Horizonte

2019

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

S586a Silva, Danyele Franca da.
2019

Aspectos epidemiológicos das leishmanioses no município de Pains, Centro Oeste Mineiro / Danyele Franca da Silva. – Belo Horizonte, 2019

XVI, 88 f.: il.; 210 x 297mm

Bibliografia: f. 70-87

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

1. Leishmaniose/epidemiologia 2. Leishmaniose/prevenção & controle 3. Proteção Social em Saúde I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Carvalho, Gustavo Mayr de Lima (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

DANYELE FRANCA DA SILVA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE
PAINS, CENTRO OESTE MINEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar (IRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna (UFMG) Titular

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

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 26/02/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, me dando sabedoria e por ter abençoado cada etapa deste trabalho.

Agradeço aos meus pais pela educação, carinho, amor e por todo apoio.

Aos meus irmãos por sempre torcerem por mim.

Ao meu noivo pela paciência, confiança, carinho e por sempre acreditar em meus sonhos.

Aos meus orientadores José Dilermando e Gustavo Mayr por terem confiado em mim para a realização deste trabalho, por terem sido atenciosos durante esses anos, sempre estando à disposição para o que precisasse e por todo carinho, apoio, incentivo e ensinamentos. Agradeço muito por ter sido orientada por vocês.

A Dra. Carina Margonari por todo carinho e ajuda durante todo o projeto e por sempre estar à disposição para o que precisasse.

As estudantes Laura, Debora e Gabriela Andrade por terem me ajudado em diversas etapas do projeto.

A Ma. Júlia pelos ensinamentos e paciência e por sempre estar à disposição para me ajudar.

Ao Dr. Felipe por ter realizado a confecção dos mapas e por sempre ter se colocado a disposição.

A Dra. Aldenise por ter realizado as análises e por todo carinho, paciência e ensinamentos.

A todos que de alguma forma contribuíram com o projeto, Dra. Célia, Dr. Gustavo Paz, Gabriel, Bruno, Rodolfo, Tina e todos os estudantes de IC já envolvidos, muito obrigada pela disponibilidade e por todo o apoio.

As meninas do laboratório pelos momentos de descontração e amizade. Em especial as amigas Juliana e Tânia pela convivência e carinho durante esses anos.

A Rosiana e Úrsula por termos compartilhado os momentos de aprendizado e aflições e pela amizade que construímos durante o mestrado.

Ao Instituto René Rachou e a todas as empresas de fomento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pela concessão da minha bolsa.

As pessoas essenciais para a realização do trabalho como os moradores de Pains, a Prefeitura Municipal de Pains, a Secretaria Municipal de Saúde, especialmente ao servidor João de Oliveira Costa (João da Merenda) por todo suporte necessário para os trabalhos de campo.

RESUMO

As leishmanioses são parasitoses de grande importância na saúde pública, causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. O objetivo do trabalho foi estudar os aspectos epidemiológicos das leishmanioses, relacionados aos flebotomíneos no município de Pains, Centro Oeste de Minas Gerais. Durante o período de maio de 2015 a abril de 2016, foram realizadas coletas sistematizadas mensais de flebotomíneos na área de ocupação urbana, utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, modelo HP, em 20 pontos previamente estabelecidos junto à secretaria de saúde do município. Foi coletado um total de 12.728 flebotomíneos, sendo 2.854 fêmeas e 9.874 machos, pertencentes a dez gêneros e 20 espécies. *Lutzomyia longipalpis* foi a mais abundante no estudo com 80% dos espécimes encontrados. A detecção de DNA de *Leishmania* foi realizada através da PCR, dirigida ao alvo ITS 1. Foi possível detectar o DNA de *Leishmania* em nove amostras, sendo: uma em *Pintomyia monticola*, *Micropygomyia quinquefer*, *Evandromyia cortelezii*, *Expapillata firmatoi*, duas em *Lutzomyia renei* e três em *Lu. longipalpis*. Para a identificação da fonte alimentar foi realizada a PCR dirigida ao gene Cyt b. Foram encontradas 249 fêmeas com vestígios de sangue em seu abdômen e o sequenciamento de 142 espécimes identificaram que elas se alimentaram em *Bos taurus*, *Cairina moschata*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus* e *Sus scrofa*. A fauna de flebotomíneos se mostrou bem distribuída por toda a área urbana, com abundância de espécies potenciais vetoras na área zona periférica, além de fêmeas com DNA de *Leishmania*. Foi possível observar que o município apresenta características epidemiológicas necessárias para ocorrência da transmissão e que suportam ainda a possibilidade de expansão das leishmanioses, apontando para necessidade da implantação de medidas profiláticas adequadas a situação local. Este trabalho foi valioso para um retorno do cenário atual da epidemiologia das leishmanioses para o município, mostrando a importância da implementação de um programa de controle e vigilância pelos órgãos competentes, a fim de prevenir este agravo e promover a saúde da população.

Palavras-chave: Epidemiologia, Flebotomíneo, Leishmaniose

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease of great importance in public health, caused by different species of the genus *Leishmania*, whose transmission occurs through the bite of females of infected sand flies. The objective of this study was to study the epidemiological aspects of leishmaniasis, related to sandflies in the municipality of Pains, Central West of Minas Gerais. During the period from May 2015 to April 2016 monthly collections of sand flies were performed in the area of urban occupation using CDC light traps, HP model, in 20 points previously established together with the Municipal Health Department. A total of 12,728 sand flies were collected, being 2,854 females and 9,874 males, belonging to ten genera and 20 species. *Lutzomyia longipalpis* was the most abundant species in the study with 80% of the specimens found. Detection of *Leishmania* DNA was performed using the PCR, directed to the ITS 1 target. It was possible to detect the *Leishmania* DNA in nine samples, being: one in *Pintomyia monticola*, *Micropygomyia quinquefer*, *Evandromyia cortelezzii*, *Expapillata firmatoi*, two in *Lutzomyia renei* and three in *Lu. longipalpis*. For the identification of the food source, the Cyt b gene directed PCR was performed. A total of 249 females with traces of blood in their abdomen were identified, and the sequencing of 142 specimens identified that they were fed on *Bos taurus*, *Cairina moschata*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus* and *Sus scrofa*, the latter species predominating as a food source. The sand flies fauna was well distributed throughout the urban area, with an abundance of potential vector species in the peripheral zone area, as well as females with *Leishmania* DNA. It was possible to observe that the municipality has epidemiological characteristics necessary for the occurrence of transmission and that also support the possibility of leishmaniasis expansion, pointing to the need for the implantation of prophylactic measures appropriate to the local situation. This work was valuable for a return of the current scenario of the epidemiology of leishmaniasis to the municipality, showing the importance of the implementation of a program of control and surveillance by the competent organs, in order to prevent this disease and promote the health of the population.

Key- words: Epidemiology, Phlebotomine, Leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Situação da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar americana na região de Formiga/MG, de 2008 a 2016.....	25
Figura 2 - Localização do município de Pains, Minas Gerais, Brasil.....	28
Figura 3 - Panorama do município de Pains (A) e alguns pontos turísticos: Formações rochosas (B,C); Gruta do Brega (D); Parque Dona Ziza (E,F,G); Pedra do cálice (H).	29
Figura 4 - Vista geral da mineração de cal no município de Pains.....	30
Figura 5 - Localização das armadilhas utilizadas nas coletas no município de Pains/MG, no período de maio de 2015 a abril de 2016.....	31
Figura 6 - Pontos de exposição mensal das armadilhas distribuídas no município de Pains/MG durante o período de maio de 2015 a abril de 2016 (os números correspondem aos pontos descritos no quadro 1).....	33
Figura 7 - Escalonamento multidimensional Não Métrico (NMDS) a partir de uma matriz de dissimilaridade calculada com os índices de Bray-Curtis (A) e Jaccard (B) utilizando os valores de abundância relativa e presença e ausência das espécies de flebotomíneos entre os diferentes pontos amostrados na área urbana de Pains/MG.....	47
Figura 8 - Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados da PCR do Cyt b a partir da extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos individuais coletadas na área urbana de Pains/MG.....	52
Figura 9 - Distribuição de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e das espécies potenciais vetoras do município de Pains/MG.....	55
Figura 10 - Densidade de Kernel dos flebotomíneos infectados, localização das potenciais espécies vetoras, dos casos de LV canina e humanos de LV e LTA do município de Pains/MG.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem das espécies de flebotomíneos coletadas na área urbana do município de Pains/MG no período de maio de 2015 a abril de 2016.....	43
Gráfico 2 - Relação das variáveis climáticas na abundância das espécies de flebotomíneos coletadas em Pains/MG de maio de 2015 a abril de 2016.....	45
Gráfico 3 - Porcentagem dos hospedeiros vertebrados identificados como fonte alimentar para fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Pains/MG no período de maio de 2015 a abril de 2016	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização ambiental e coordenada dos pontos de exposição das armadilhas luminosas (modelo HP) utilizadas nas coletas mensais realizadas no município de Pains/MG, entre maio de 2015 e abril de 2016.....	32
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos de LT e LV no município Pains, MG, no período de 2002 a 2019	26
Tabela 2 - Flebotomíneos coletados com armadilha CDC no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016	42
Tabela 3 - Distribuição mensal dos flebotomíneos coletados em Pains/MG no período de maio de 2015 a abril de 2016	44
Tabela 4 - Total de flebotomíneos coletados no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016, segundo os pontos de coleta	46
Tabela 5 - Fêmeas de flebotomíneos analisadas e taxa de infecção no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016.....	49
Tabela 6 - Detecção de DNA e identificação de espécies de <i>Leishmania</i> nas fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016	50
Tabela 7 - Fêmeas de flebotomíneos alimentadas coletadas no município de Pains/MG, no período de maio de 2015 a abril de 2016	51
Tabela 8 - Fontes alimentares das fêmeas de flebotomíneo coletadas no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CP - controle positivo

CN - controle negativo

Cyt b - Citocromo b

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

dNTP - Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

Ev - Evandromyia

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

ITS1 - Internal Transcribed Spacer 1

Km² - Quilômetro quadrado

kDNA - DNA do cinetoplasto

IRR - Instituto René Rachou

Le - Leishmania

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu - Lutzomyia

LV - Leishmaniose Visceral

Mi - Micropygomyia

Min - Minutos

MG - Minas Gerais

Mg - Migonemyia

mL - Mililitros

mM - milimolar

mm³ - Milímetros cúbicos

NMDS - Escalonamento Multidimensional Não-Métrico

Ny - Nyssomyia

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - Pares de bases

PCR - Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

Pi - Pintomyia

PM - Peso molecular

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos).

RPM - Rotação por minuto

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS - Secretaria Municipal de Saúde

WHO - World Health Organization

μL - microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Leishmanioses	17
1.1.1 Leishmaniose tegumentar	17
1.1.2 Leishmaniose visceral	19
1.2 Vetores de <i>Leishmania</i> spp.	19
1.3 Detecção de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos	22
1.4 Estudo do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos.....	23
1.5 As leishmanioses nos centros urbanos.....	24
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Área de estudo	28
4.2 Estudo entomológico	30
4.2.1 Escolha dos domicílios	30
4.2.2 Coletas sistematizadas	30
4.2.3 Processamento dos flebotomíneos coletados	34
4.2.4 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos	34
4.3 Dados climáticos	35
4.4 Análise da fauna flebotomínica	35
4.5 Mapeamento das áreas de risco	35
4.6 Métodos moleculares para o estudo de <i>Leishmania</i> spp. nos flebotomíneos	36
4.6.1 Extração do DNA das fêmeas não alimentadas	36
4.6.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer 1	37

4.7 Métodos moleculares para o estudo da identificação do repasto sanguíneo das fêmeas alimentadas	38
4.7.1 Extração do DNA das fêmeas alimentadas	38
4.7.2 PCR dirigida ao gene do Citocromo b de vertebrados	39
4.8 Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Estudo da fauna de flebotomíneos	41
5.2 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos	47
5.3 Identificação da fonte alimentar das fêmeas de flebotomíneos	51
5.4 Mapeamento das áreas de risco das leishmanioses	54
6 DISCUSSÃO	57
6.1 A fauna flebotomínica e sua infecção por <i>Leishmania</i>	57
6.2 Variáveis climáticas X Abundância dos flebotomíneos	61
6.3 Identificação da fonte alimentar das fêmeas de flebotomíneos	63
6.4 Mapeamento das áreas críticas e a possível situação do risco de transmissão das leishmanioses no município de Pains	66
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	88
Anexo 1 - Licença permanente para coleta de material zoológico	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são parasitoses de grande importância na saúde pública, causadas por diferentes espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* Ross, 1903, podendo acometer o ser humano basicamente em duas formas clínicas, visceral e tegumentar. O modo de transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, dípteros holometábolos pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Lainson e Shaw, 2005; Brazil et al., 2015; Brasil, 2017).

O parasita se apresenta sob duas formas: a flagelada denominada promastigota, encontrada em hospedeiros invertebrados e a amastigota encontrada no interior de células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado (Lainson & Shaw, 1987; Gontijo & Carvalho, 2003).

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, afetando indivíduos economicamente desfavorecidos, principalmente nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco, com 1 a 1,5 milhões de casos registrados a cada ano para as formas cutâneas e cerca de 500.000 casos para a forma visceral (Desjeux, 2004; Alvar et al, 2012; WHO, 2015; Brazil, 2017).

1.1.1 Leishmaniose tegumentar

Segundo a OMS, a forma tegumentar das leishmanioses é a mais prevalente no mundo, sendo registrada em 87 países distribuídos por quatro continentes, Ásia, África, Europa e América. As manifestações clínicas podem ser diversas, e incluem as formas cutânea localizada, disseminada, difusa e mucosa, sendo que nesta última pode ocorrer destruição do septo nasal e palato, resultando em mutilações e transtornos psicossociais (Murray et al., 2005; Goto & Lindoso, 2010; Brasil, 2017;WHO, 2018).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) antes restrita a ambientes florestais era considerada apenas uma zoonose de animais silvestres e

acometia as pessoas quando as mesmas adentravam nestes ambientes. Atualmente devido ao crescente desmatamento e o avanço da urbanização para as áreas florestais, o ciclo natural foi alterado, modificando o perfil da doença, principalmente a adaptação dos vetores, contribuindo assim para a ocorrência de novos casos (Lainson & Shaw, 2005; Pimenta et al., 2013; Brasil, 2017).

No Brasil existem sete espécies de *Leishmania* que manifestam a forma tegumentar, sendo elas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lindenberg*, sendo que a maior parte dos casos de LTA tem sido atribuída a *Le. braziliensis*, tendo a mesma, uma maior distribuição geográfica (Gontijo & Carvalho, 2003; Lainson & Shaw, 2005; Lainson, 2010, Brazil et al., 2015).

Diversas espécies de flebotomíneos participam da transmissão da LTA no Brasil. Algumas são incriminadas como vetoras de *Le. braziliensis*, como *Nyssomyia intermedia*, *Ny. whitmani*, *Ny. neivai* e *Migonemyia migonei*. Outras espécies podem estar envolvidas no ciclo de transmissão por terem sido encontradas naturalmente infectadas, mas ainda não foram comprovadas como vetoras (Gontijo & Carvalho, 2003; de Souza et al., 2006; Margonari et al., 2006, Rangel & Lainson, 2009; Lainson, 2010, Brazil et al., 2015).

Com relação aos reservatórios, destacam-se algumas espécies de animais silvestres das ordens Rodentia, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata e Chiroptera (Ashford, 1996; Gontijo & Carvalho, 2003; Roque & Jansen, 2014). Vale destacar a relevância dos animais sinantrópicos, como o rato e o gambá, por estarem próximos aos humanos tendo assim grande importância no ciclo da LTA (Brandão-Filho, et al., 2003). Alguns animais domésticos como os cães têm sido encontrados parasitados com *L. (V.) braziliensis* (Madeira et al., 2005; Castro et al., 2007; Brilhante et al., 2016), porém seu papel não está bem esclarecido no ciclo da LTA. Alguns estudos indicam que não são bons reservatórios de *L. (V.) braziliensis* (Madeira et al., 2005; Castro et al., 2007), sendo assim como os seres humanos, hospedeiros acidentais. No entanto, no ambiente peridoméstico os cães podem ter papel importante no perfil de transmissão intra e peridomicíliar, por atuarem como atrativos para os vetores (Dantas-Torres, 2007).

1.1.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é causada nas Américas pela *Le. infantum* e possui uma grande importância na saúde pública devido à sua ampla distribuição e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas e idosos. É uma doença crônica grave, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (Maia-Elkhoury et al., 2008; Brasil, 2010).

A LV era uma zoonose de caráter rural, mas recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, se tornando um crescente problema de saúde pública com grande expansão geográfica (Maia-Elkhoury et al., 2008; Brasil, 2010; Brasil, 2017).

A espécie de flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis* é uma das principais vetoras da *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2005). Conforme estudos, outras espécies também estão envolvidas na transmissão em algumas regiões do país na ausência de *Lu. longipalpis*, como a espécie *Lu. cruzi* no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998) e *Mg. migonei* em Pernambuco (Carvalho et al., 2010).

Na área urbana o cão doméstico é a principal reservatório para flebotomíneos (Ashford, 1996; Brasil, 2010). Já no ambiente silvestre os reservatórios são canídeos como *Cerdocyon thous* e *Lycolopex vetulus* (Deane & Deane, 1954; Grimaldi et al., 1989), além de marsupiais como o *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*, entre outros (Sherlock et al., 1984; Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi et al., 1989; Roque & Jansen, 2014).

1.2 Vetores de *Leishmania*

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, com quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Brazil & Brazil, 2003). Sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo em abundância nas regiões tropicais e estão presentes em ambientes silvestres, rurais e urbanos (Rangel & Lainson, 2003; Sherlock, 2003).

As formas larvais possuem aspecto vermiforme e os adultos, por sua vez, apresentam porte pequeno, com cerca de 2 a 3 mm de comprimento, são amarelados ou castanhos, corpo piloso e pernas alongadas (Brazil & Brazil, 2003).

Os adultos permanecem em abrigos durante o dia, os quais podem ou não, estar associados aos criadouros naturais ou fontes alimentares (Brazil & Brazil, 2003). Costumam abrigarem-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, arbustos, frestas em rochas e cavernas (Galati et al., 2003). Também são encontrados invadindo abrigos de animais domésticos (currais, chiqueiros e galinheiros) e nos domicílios, abrigando-se em locais escuros, fendas de paredes, dentre outros ambientes, demonstrando que se encontram em processo de adaptação (Tolezano et al., 2001).

A hematofagia é realizada somente pelas fêmeas que saem de seus abrigos em busca de repasto sanguíneo ao entardecer e durante a noite. Entretanto algumas espécies apresentam registro desta atividade diurna, como *Lu. wellcomei* (Brazil & Brazil, 2003; Sacks et al., 2008). O sangue ingerido é necessário para a maturação dos ovários. Como fontes nutritivas, fêmeas e machos, alimentam-se de seiva de plantas e de soluções açucaradas. As larvas dos flebotomíneos são terrestres e seus criadouros compreendem locais com acúmulo de matéria orgânica. Porém, pouco se sabe sobre o criadouro natural, uma vez que seu encontro é raro (Brazil & Brazil, 2003).

Os flebotomíneos são hospedeiros de vários microorganismos, incluindo agentes etiológicos de doenças de importância médica e veterinária, como vírus, bactérias e protozoários (Shaw et al., 2003; Sherlock, 2003). Vários gêneros de protozoários tripanossomatídeos são encontrados parasitando este grupo de inseto, dentre os quais *Endotrypanum*, *Trypanosoma*, *Sauroleishmania* e *Leishmania*. Apenas este último gênero é patogênico para o homem tendo como vetores os flebotomíneos, fato que dá a esses insetos grande importância na transmissão das leishmanioses em várias regiões do mundo, incluindo as Américas (Young & Duncan, 1994; Alvar et al., 2012, Brazil et al., 2015).

Já foram descritas cerca de 1.000 espécies de flebotomíneos em todo o mundo, com maior abundância encontrada na região Neotropical totalizando em torno de 530 espécies, sendo no Brasil registradas 274 (Shimabukuro et al., 2011; Andrade & Gurgel-Gonçalves, 2015). Entre estas, pouco mais de 20 espécies são

consideradas comprovadas vetoras de *Leishmania* no Novo Mundo. Esse número de vetores é pequeno quando comparado ao número de espécies e isso é devido a vários fatores fisiológicos e bioquímicos inerentes a ambos os insetos e parasitas. Esses fatores interferem na sobrevivência dos parasitas no trato digestório do inseto, sua multiplicação e transformações que resultam no desenvolvimento de formas infecciosas, influenciando na transmissão ao hospedeiro vertebrado (Killick-Kendrick, 1990; Galati, 2003).

Em Minas Gerais diversas espécies de flebotomíneos já foram encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania* ou tiveram seu DNA extraído desses insetos. Dentre essas podemos destacar *Lu. longipalpis* (Saraiva et al., 2010; Michalsky et al., 2011), principal vetora da *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Lainson & Rangel, 2005). Com relação a *Le. braziliensis*, agente causador da LTA, já foram registradas as espécies *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Ny. neivai*, *Pintomyia fischeri*, *Pi. pessoai*, *Psychodopygus lloydi* e *Ps. hirsutus* (Saraiva et al., 2010, Saraiva et al., 2008, Rangel et al., 1985; Margonari et al., 2010; Quaresma et al., 2012). Além destas, outras espécies de flebotomíneos, cujo papel epidemiológico ainda não está claro, tem sido encontradas com *Leishmania*, tais como: *Ev. cortellezzi*, *Ev. sallesi*, *Ev. termitophila*, *Ev. lenti*, *Pi. monticola*, entre outras (Margonari, 2010, Saraiva et al., 2008, Saraiva et al. 2010, Carvalho et al. 2008).

Estas espécies também têm demonstrado considerável grau de adaptação ao ambiente antropizado, além de comportamento antropofílico (Gomes & Neves, 1998; Rangel et al., 1984; Gontijo et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Andrade Filho et al., 2007; Carvalho et al., 2008). O processo de urbanização e toda modificação ambiental que vem ocorrendo tem afetado diretamente na adaptação dos flebotomíneos a este novo ambiente. Com isso, seu hábito antropofílico aliado a frequência no peri e intradomicílio, mostra que estão cada vez mais próximos aos humanos e reservatórios domésticos, participando ativamente do ciclo de transmissão (Forattini, 1976), tornando-se um fator epidemiológico preocupante. Com isso o conhecimento dos seus hábitos e de seu papel na transmissão das leishmanioses é de grande importância para a saúde pública (Gontijo & Melo, 2004; Almeida et al., 2010).

1.3 Detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Recentemente, as técnicas moleculares têm possibilitado bons resultados na identificação das espécies de *Leishmania* spp. em flebotomíneos naturalmente infectados, por apresentar grande sensibilidade, ser relativamente rápida, além de diferenciar as espécies utilizando pouca quantidade de DNA (Aransay et al., 2000; Cabrera et al., 2002).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Saiki et al. (1988) é uma técnica com a capacidade de produzir centenas de cópias de DNA, podendo ser utilizadas em diversos estudos entomológicos e para variados alvos e finalidades (Cabrera et al., 2002).

É importante ressaltar que a identificação da presença de DNA de uma determinada espécie de *Leishmania* em um flebotomíneo por técnicas moleculares não significa que ela é vetora. Após a fêmea realizar o repasto em um animal infectado, pode ser que a *Leishmania* não realize seu ciclo no vetor, não levando a infecção adiante (Cabrera et al., 2002; Lainson & Shaw, 2005).

Além disso, para comprovar um flebotomíneo como vetor deve-se atender a vários critérios sugeridos por Killick-Kendrick (1990) e Ready (2013), como ser antropofílico; a distribuição do vetor deve coincidir com a distribuição da doença no homem; suportar o desenvolvimento dos parasitos na ausência de sangue no tubo digestório; o parasito isolado do flebotomíneo deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos; demonstrar que o flebotomíneo é essencial para manter a transmissão com ou sem a participação de outras espécies vetoras; demonstrar que a incidência da doença diminui significativamente com uma redução na densidade do flebotomíneo específico; dentre outros.

Diversos alvos são utilizados nas técnicas moleculares para a detecção e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos, como regiões do kDNA dos parasitos, subunidade menor do RNA ribossomal (SSU), a região intergênica 1 (ITS 1), dentre outras (Harris et al., 1998; Graça et al., 2012; Freitas-Lidani et al., 2014; Rêgo et al., 2015). Esses alvos possuem diferentes graus de sensibilidade e especificidade, sendo necessário o complemento com outras técnicas, como a RFLP e/ou reações de sequenciamento de DNA para a identificação dos parasitos.

Segundo Michalsky et al. (2002), a verificação da taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação correta da *Leishmania* infectante em determinada espécie de flebotomíneo, são de grande importância nos estudos epidemiológicos. Assim, as técnicas moleculares têm se mostrado eficientes para conhecer o papel destas, na transmissão do parasito em determinada região (Paiva et al., 2007).

1.4 Estudo do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos

O estudo do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos é fundamental para o conhecimento dos aspectos ecológicos e epidemiológicos, contribuindo para o conhecimento dos possíveis reservatórios e hospedeiros e conseqüentemente para estratégias de controle (Haouas et al., 2007).

As técnicas moleculares têm mostrado resultados satisfatórios nos estudos de repasto sanguíneo nos flebotomíneos (Michael et al., 2001; Kent & Norris, 2005; Steuber et al., 2005; Sant'Anna et al., 2008; Quaresma et al., 2012; Valinsky et al., 2014, Sales et al., 2015, Carvalho et al., 2017). Os marcadores de genes mitocondriais tem sido alguns dos alvos da PCR mais utilizados para a identificação do sangue ingerido por insetos (Coulson et al., 1990; Kent & Norris et al., 2005; Molaei et al., 2008). O gene mitocondrial do citocromo b (Cyt b), tem se mostrado eficiente por ser uma região do genoma mitocondrial muito conservada, que não sofre recombinação, além de possuir sequências de DNA completas de vertebrados no banco de dados (Genbank) (Perkins & Schall, 2002).

Embora a amplificação correta do DNA dependa especialmente da seleção apropriada de primers, o método de armazenamento da amostra e o processo de extração são aspectos importantes, que contribuem para o sucesso do resultado (Cabrera et al., 2002). Assim, a técnica de PCR aliada ao sequenciamento de DNA tem auxiliado na identificação das fontes alimentares dos flebotomíneos, contribuindo para a compreensão do ciclo de transmissão das leishmanioses e auxiliando no estudo ecológico destes insetos.

1.5 As leishmanioses nos centros urbanos

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV com casos humanos e caninos em várias cidades de grande e médio porte (Gontijo & Melo, 2004; Werneck, 2008; Góes et al, 2014; Ortiz & Anversa, 2015). Mudanças ambientais derivadas das ações humanas, como o rápido processo de urbanização mudaram a ecologia de algumas espécies de flebotomíneos, e conseqüentemente a eco-epidemiologia das leishmanioses, levando a um significativo impacto na distribuição e nas taxas de mortalidade por LV (Aguilar et al., 1987; Marzochi & Marzochi, 1994; Werneck, 2008; Oliveira et al., 2013).

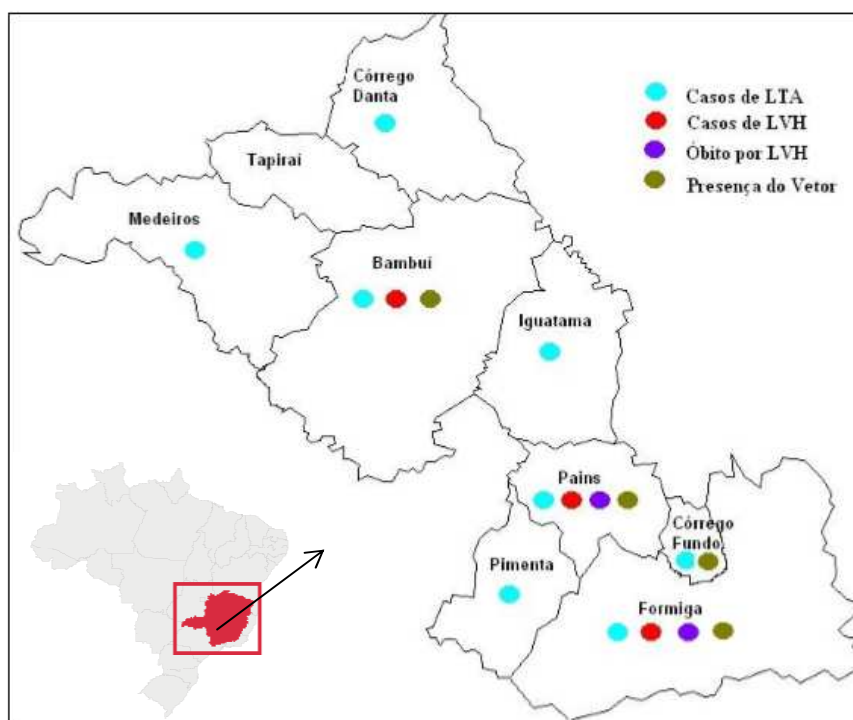
Assim como a LV, a LT também vem se urbanizando, estando presente em grandes cidades do Brasil como Campinas no estado de São Paulo, entre outros municípios (Silva & Cunha, 2007; Benicio et al., 2015). Antes era restrita a animais silvestres e transmitida acidentalmente aos trabalhadores de exploração florestal, abertura de estradas e mineração. A ocupação não regulamentada das áreas florestais e destruição dos habitats naturais conseqüentemente favoreceu o contato direto entre humanos, vetores e reservatórios. Esta situação associada ao hábito alimentar oportunista de algumas espécies de flebotomíneos e sua facilidade de adaptação às condições do ambiente antropizado e a diferentes temperaturas, pode ter contribuído para a urbanização das leishmanioses (Rangel & Vilela, 2008).

Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco se conhece sobre a epidemiologia das leishmanioses nos focos urbanos. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no rural (Gontijo & Melo, 2004). Portanto, é de extrema relevância o conhecimento da fauna de flebotomíneos e das possíveis espécies vetorais, já que cada espécie apresenta sua peculiaridade biológica e ecológica. Assim, o conhecimento da interação entre as mudanças ambientais urbanas, reservatórios e flebotomíneos vetores se faz necessário para projeções de estratégias apropriadas de medidas de controle das leishmanioses (Costa et al., 1999; Carvalho et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Na região do Centro Oeste de Minas Gerais, mais precisamente na região de Formiga, vem sendo observado o aumento no número de casos humanos de LTA e recentemente de LV (Figura 1). Segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde (SMS, 2014), um inquérito canino realizado em Formiga nos locais onde aconteceram os casos de LV, apresentou 19% de soropositividade (Menezes, 2014). Esses fatos apontam para a necessidade de estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses na região, incluindo aspectos relacionados aos possíveis vetores e reservatórios.

Figura 1. Situação da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar americana na região de Formiga/MG, de 2008 a 2016



Fonte: Menezes, 2014; DATASUS, 2018 (modificada)

Pains, município que faz parte da microrregião de Formiga, apresenta todos os fatores para a ocorrência da doença, inclusive o registro de um óbito por LV (Figura 1). A cidade não apresenta um centro de zoonoses e não possui estudos sobre a doença. De 2002 a 2019 foram notificados 24 casos autóctones de LTA e oito casos de LV na zona urbana (Tabela 1).

Tabela 1. Número de casos de LT e LV no município Pains, MG, no período de 2002 a 2019

Doença/Ano	Ano de notificação													Total
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2012	2013	2015	2019	
LT	1	3	1	0	5	1	1	7	4	1	0	0	0	24
LV	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2	1	1	1	8
Total	1	3	2	0	5	2	1	8	4	3	1	1	1	32

Fonte: DATASUS, 2018; Secretaria de Saúde de Pains, 2019

Em 2016 foi realizada uma pesquisa sorológica amostral canina no município, onde foi verificada a positividade de 8,2% dos cães para *Leishmania* (dados não publicados). Além disso, Pains é um dos principais municípios produtores de cal do Brasil (Brasil, 2009; Brasil, 2015). Esta atividade gera um processo de desmatamento alterando o ecossistema local, incluindo a fauna silvestre, fonte de alimentação para os flebotomíneos. Essa alteração no ambiente pode afetar a ecologia de algumas espécies fazendo com que os flebotomíneos procurem outras fontes de alimentação, possibilitando o aumento do contato destes insetos com cães e humanos, acarretando na transmissão das leishmanioses (Patz et al., 2004; Saha et al., 2011; Hausermann et al., 2012; Confalonieri et al., 2013; Rosário et al., 2016).

Diante dos fatores citados, faz-se necessário à realização de estudos sobre os flebotomíneos, a fim de conhecer a fauna local, as espécies vetoras, as espécies de *Leishmania* circulantes e seus reservatórios, com o intuito de elucidar aspectos epidemiológicos que envolvem o ciclo das leishmanioses no município, visando auxiliar no direcionamento das medidas de controle adequadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os aspectos epidemiológicos das leishmanioses, relacionados aos flebotomíneos no município de Pains, Centro Oeste de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos:

- 1- Identificar a fauna de flebotomíneos no município de Pains;
- 2- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* nas fêmeas coletadas;
- 3- Identificar as espécies de *Leishmania* detectadas nos flebotomíneos;
- 4- Identificar a fonte alimentar das fêmeas de flebotomíneos com sinais de sangue no abdômen;
- 5- Avaliar se as variáveis climáticas interferem na densidade populacional dos flebotomíneos;
- 6- Identificar as prováveis áreas críticas e a possível situação do risco de transmissão no município com relação às leishmanioses.

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O município de Pains faz parte da microrregião de Formiga e está localizado na região Centro Oeste de Minas Gerais (Figura 2) a 230 km de Belo Horizonte. Possui uma população estimada de 8.270 habitantes (IBGE, 2018) e uma área territorial de 421,862 Km². O município possui belas paisagens e conta com áreas de alto potencial espeleológico, tendo registro de mais de mil cavidades naturais (Figura 3) (Muniz & Fernandes, 2013). Além disso, a área estudada sofre com os impactos antrópicos da mineração (Figura 4) e agricultura. O município é um dos grandes produtores de cal de Minas Gerais (Brasil, 2009; Brasil, 2015). Essa atividade gera um processo de degradação ambiental alterando o ecossistema local, consequentemente acarretando na transmissão de doenças para a população, como as leishmanioses, malária, entre outras (Patz et al., 2004; Saha et al., 2011; Hausermann et al., 2012; Confalonieri et al., 2013; Rosário et al., 2016). Em 2002 foi notificado o primeiro caso humano de LT na zona urbana do município e até 2019, foram notificados 24 casos autóctones de LTA e oito casos de LV, com um óbito.

Figura 2. Localização do município de Pains, Minas Gerais, Brasil



Fonte: pt.wikipedia.org/wiki/Pains

Figura 3. Panorama do município de Pains (A) e alguns pontos turísticos: Formações rochosas (B,C); Gruta do Brega (D); Parque Dona Ziza (E,F,G); Pedra do cálice (H)



A

Fonte: pains.mg.gov.br



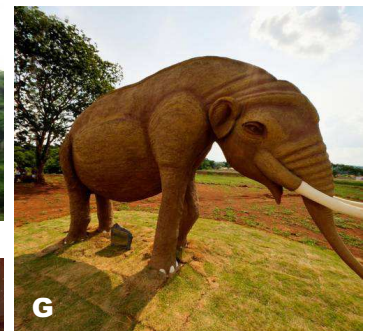
B

Fonte: curtamais.com.br



C

Fonte: curtamais.com.br



G

Fonte: pains.mg.gov.br



D

Fonte: lickr.com



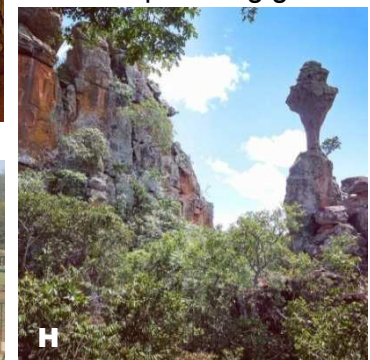
E

Fonte: pains.mg.gov.br



F

Fonte: pains.mg.gov.br



H

Fonte: deskgram.net

Figura 4. Vista geral da mineração de cal no município de Pains



Fonte: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2017

4.2 Estudo Entomológico

4.2.1 Escolha dos domicílios

O trabalho de coletas sistemáticas de flebotomíneos teve início em maio de 2015, depois de uma avaliação dos bairros que compõem o município de Pains. A orientação na escolha dos locais de coleta dentro de cada bairro foi feita de acordo com as informações fornecidas pela Secretaria de Saúde de Pains baseado na ocorrência de casos caninos e humanos de leishmaniose. Além disso, os pontos amostrais escolhidos apresentaram ambientes propícios ao encontro dos flebotomíneos. As casas estudadas possuíam quintais, presença de pomares e plantas ornamentais, presença de animais domésticos como cães, galinhas, pássaros, dentre outros.

4.2.2 Coletas sistematizadas

As coletas dos flebotomíneos foram realizadas sob a licença número 15237-2 (Anexo 1), durante o período de maio de 2015 a abril de 2016, destinada ao estudo da fauna de flebotomíneos, detecção do DNA de *Leishmania* e identificação da fonte alimentar. As armadilhas utilizadas neste tipo de coleta foram luminosas CDC, modelo HP (Pugedo et al., 2005). Foram instaladas 20 armadilhas (Quadro 1), uma

em cada residência escolhida, em diferentes bairros, tentando abranger ao máximo a área do município (Figura 5). As mesmas ficaram expostas no peridomicílio das casas e quando presente, em anexos como galinheiro e canil (Figura 6). As armadilhas foram instaladas a um metro do solo e ficaram expostas durante dois dias consecutivos mensais, totalizando 48 horas de esforço amostral por armadilha.

Figura 5. Localização das armadilhas utilizadas nas coletas no município de Pains/MG, no período de maio de 2015 a abril de 2016



Fonte: Elaborado por Felipe Rêgo

Quadro 1. Caracterização ambiental e coordenada dos pontos de exposição das armadilhas luminosas (modelo HP) utilizadas nas coletas mensais realizadas no município de Pains/MG, entre maio de 2015 e abril de 2016

Pontos	Caracterização ambiental	Latitude	Longitude
Ponto 1	Residência com presença de coleção de água (riacho), presença de vegetação nativa e de cultivo, peridomicílio sem pavimento e presença de animais de criação (galinha e cão).	-20.377.612	-45.650.425
Ponto 2	Residência com presença de formações rochosas no peridomicílio, vegetação de cultivo, peridomicílio sem pavimento e com a presença de animais de criação (galinha, cão e coelho).	-20.372.611	-45.657.643
Ponto 3	Residência com presença de formações rochosas calcárias associada à áreas de mata muito próximas ao peridomicílio (menos de 100 metros de distância), presença de animais de criação (galinha, cão e gado).	-20.370.215	-45.658.916
Ponto 4	Residência com presença de formações rochosas calcárias associada à áreas de mata muito próximas ao peridomicílio (menos de 100 metros de distância) e presença de cão.	-20.367.380	-45.660.699
Ponto 5	Residência com presença de formações rochosas calcárias associada à áreas de mata (menos de 100 metros de distância), presença de animais de criação (cão e galinha).	-20.366.197	-45.661.644
Ponto 6	Residência com peridomicílio sem pavimento e com a presença de animais de criação (galinha e gato).	-20.365.575	-45.663.524
Ponto 7	Comércio na área central com criação de frangos e galinheiro pavimentado.	-20.366.901	-45.662.769
Ponto 8	Residência central, peridomicílio pequeno com árvores frutíferas, sem pavimento e sem animais de criação.	-20.371.622	-45.660.498
Ponto 9	Residência com peridomicílio sem pavimento e com a presença de galinhas.	-20.375.978	-45.660.825
Ponto 10	Residência com a presença de formações rochosas calcárias associadas às áreas de mata muito próximas ao peridomicílio (menos de 50 metros de distância), presença de animais de criação (cão e galinha).	-20.378.446	-45.658.618
Ponto 11	Lote vago formado por grande pedreira, com a presença de animais de criação (galinha, pato e cão).	-20.377.183	-45.662.012
Ponto 12	Fazenda com criação de animais (gado, galinha, porco, cão); área próxima à formações rochosas calcárias associada com áreas de mata nativa.	-20.363.216	-45.669.044
Ponto 13	Hospital do município, área central, pequena área com plantio de bananeiras.	-20.368.423	-45.664.297
Ponto 14	Residência com a presença de um peridomicílio sem pavimento e com criação de galinha.	-20.370.315	-45.662.960
Ponto 15	Residência com presença de coleção de água (riacho) próximo, presença de vegetação nativa e de cultivo, peridomicílio sem pavimento e presença de animais de criação (galinha, cão e gato).	-20.371.188	-45.664.996
Ponto 16	Residência com presença de coleção de água (riacho) próximo, presença de vegetação nativa e de cultivo, peridomicílio sem pavimento e presença de animais de criação (galinha, cão, gato, porco e gado).	-20.366.635	-45.666.919
Ponto 17	Residência instalada ao fundo de um grande lote utilizado para criação de animais (galinha e cão).	-20.374.297	-45.662.775
Ponto 18	Fazenda com criação de animais (gado, galinha, porco e cão); área próxima às formações rochosas calcárias associadas com áreas de mata nativa.	-20.373.542	-45.669.965
Ponto 19	Residência próxima a de área de cultivo de eucalipto, peridomicílio com a presença de animais de criação (galinha, gado e cão).	-20.386.472	-45.676.392
Ponto 20	Residência com a presença de formações rochosas calcárias associada à áreas de mata muito próximas ao peridomicílio (menos de 50 metros de distância), presença de animais de criação (cão e galinha).	-20.384.663	-45.674.521

Fonte: Elaborado por Gustavo Mayr

Figura 6. Pontos de exposição mensal das armadilhas distribuídas no município de Pains/MG durante o período de maio de 2015 a abril de 2016 (os números correspondem aos pontos descritos no quadro 1)



Fonte: Gustavo Mayr

4.2.3 Processamento dos flebotomíneos coletados

Os insetos coletados foram sacrificados em vapor de éter no campo. Após o recolhimento das armadilhas foram acondicionados a temperatura ambiente em tubos de ensaio contendo álcool a 70%, rotulados e levados para o laboratório para a realização da triagem e sexagem dos flebotomíneos. Os machos foram acondicionados à temperatura ambiente em microtubos contendo álcool a 70%, posteriormente foram preparados e montados entre lâmina e lamínula conforme técnicas modificadas por Langeron (1949). Todos os espécimes coletados foram identificados através de características morfológicas seguindo a classificação de Galati (2003). As fêmeas foram acondicionadas em solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) à 6%, que tem ação de preservação das células, evitando a morte celular. Foram mantidas no freezer sob temperatura de -20°C, até o momento de dissecação. Foram separadas as fêmeas alimentadas, aquelas que tinham vestígios de sangue em seu abdômen, das não alimentadas. Ambas foram retiradas com agulha de insulina estéril e colocadas sob lâmina. Foram dissecadas retirando-se os três últimos segmentos e a cabeça e montadas em berlese, que permite melhor visualização das estruturas internas para a identificação da espécie. O restante do corpo foi acondicionado individualmente a seco em tubo de 1,5 ml estéril.

4.2.4 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos

Todos os machos coletados e 172 fêmeas do primeiro mês de coleta foram submetidos à técnica de preparação para a montagem. Essas fêmeas foram escolhidas aleatoriamente para conhecer melhor a fauna presente no município, uma vez que não se conhecia as espécies presentes. Ambos foram transferidos para uma placa de Petri contendo hidróxido de potássio 10% por 3 horas. Em seguida foram transferidos para outra placa contendo ácido acético 10% por 15 minutos e posteriormente foram lavados em Água do Tipo I por 15 min em três séries. Na última etapa foram colocados em uma placa contendo Lactofenol onde permaneceram por 24 horas. Após este processo foram montados entre lâmina e lamínula utilizando o líquido de Berlese. Devido à semelhança entre as fêmeas do gênero *Brumptomyia* as mesmas não foram identificadas até o nível de espécie.

4.3 Dados climáticos

Os dados climáticos de umidade relativa do ar, pluviosidade e temperatura média, referentes ao período de estudo, foram obtidos mensalmente no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados foram provenientes da Estação Meteorológica Convencional localizada no Município de Bambuí, Minas Gerais, localizada aproximadamente a 60 km de distância de Pains.

4.4 Análise da fauna flebotomínica

A similaridade da comunidade das espécies de flebotomíneos entre os pontos de coletas amostrados na região urbana do município de Pains foi determinada por meio do Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) baseado em uma matriz de dissimilaridade calculada segundo o índice de Bray-Curtis para os dados de abundância relativa das espécies de flebotomíneos e o índice de Jaccard para os dados de presença e ausência das espécies.

Foi utilizada uma Análise Multivariada Permutacional não paramétrica (PERMANOVA) com 999 replicações ao longo da distância de matrizes (Anderson, 2001) para testar diferença na comunidade de espécies de flebotomíneos entre os diferentes pontos amostrados. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico Vegan (Oksanen et al. 2010) do software R 3.2.4 (R Development Core Team, 2010).

Para avaliar a influência das variáveis climáticas em relação ao número de flebotomíneos coletados foi utilizado o teste estatístico não paramétrico qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade (p) do erro foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

4.5 Mapeamento das áreas de risco

Após a análise dos resultados epidemiológicos foi realizado um mapa de risco do município identificando as possíveis áreas críticas com relação às leishmanioses. A elaboração do mapa de Densidade de Kernel foi realizado a partir da ferramenta de Análise Espacial do software ArcGis 10.2 e os pontos de coleta foram georreferenciados através do aparelho GPS.

A estimativa de Kernel é um método estatístico não paramétrico de interpolação exploratória que gera uma superfície de densidade para a identificação de “áreas quentes”, as quais possuem uma concentração de eventos indicando de alguma forma a aglomeração em uma distribuição espacial (Silverman, 1986; Ministério da Saúde, 2007). Esta análise foi utilizada para a identificação das áreas de risco do município levando em consideração a presença de flebotomíneos infectados por *Leishmania*. Para sua confecção foi utilizado os dados dos flebotomíneos positivos para *Leishmania* pela técnica de PCR dirigida ao alvo ITS 1.

Para a análise conjunta dos dados foi acrescentado ao mapa à localização das potenciais espécies vetoras encontradas no trabalho. Foi incluído também os dados caninos de outro trabalho realizado no município em 2016 (dados não publicados) e os casos humanos de LT e LV adquiridos na Secretaria Municipal de Saúde e no SINAM. Cabe enfatizar que de 32 casos humanos notificados de 2002 a 2019 no município apenas 12 foram acrescentados ao mapa devido à falta de dados.

4.6 Métodos moleculares para o estudo de *Leishmania* spp. nos flebotomíneos

4.6.1 Extração do DNA das fêmeas não alimentadas

As fêmeas coletadas, que não apresentaram sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen, foram dissecadas e identificadas como relatado anteriormente e seu abdômen foi separado para a detecção da infecção por *Leishmania* spp.. pela técnica de PCR. Elas foram agrupadas em pools de até 10 indivíduos, todas pertencentes à mesma espécie, localidade e data de coleta para a realização da extração de DNA.

Para extrair o DNA foi utilizado o kit GenraPuregene (Qiagen, USA) seguindo as instruções do fabricante. As fêmeas foram maceradas em microtubo com auxílio do pistilo e colocado 100 µL de solução de lise celular para uma fêmea ou 200 µL para pool de até 10 fêmeas. Em seguida foi adicionado 1 µL de proteinase K (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para pool de até 10 fêmeas) e misturadas por inversão, incubadas a 55°C durante à noite. Pela manhã foi adicionado 1 µL de RNase (para uma fêmea) ou 1,5 µL (para pool de até 10 fêmeas) e misturado por inversão. As amostras foram

incubadas a 37°C por 30 minutos e em seguida, incubadas por 10 min no gelo. Foi adicionado 100 µL de solução de precipitação de proteínas, passado no vortex e na centrífuga por 5 min para formação do pellet. Foram colocados 300 µL de isopropanol em um microtubo estéril de 1,5 mL e adicionado o sobrenadante do passo anterior vertendo cuidadosamente. Foi misturado 50 vezes por inversão e em seguida centrifugada por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os tubos foram invertidos contra um papel absorvente para a secagem durante 60 min. Em seguida foi adicionado 300 µL de etanol 70% e invertido várias vezes para lavar o pellet de DNA. Na próxima etapa foram adicionados 30 µL de acetato de sódio 10% e levado ao freezer por 60 min. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e descartado o sobrenadante. Para a etapa de secagem, os tubos foram colocados no equipamento speed vac (60 min. a 45°C), deixando o DNA completamente seco. Para a etapa final, foram adicionados 30 µL de solução de hidratação de DNA e as amostras foram incubadas a 65°C por 60 min. Logo após, as amostras foram incubadas durante a noite a temperatura ambiente e pela manhã foram armazenadas no freezer.

4.6.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer 1

Após a extração de DNA, foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase dirigida ao Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) do DNA ribossomal de *Leishmania* para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. nas fêmeas de flebotomíneos coletadas. A técnica dirigida ao alvo ITS1 amplifica uma região de 300 a 350 pares de bases, utilizando os iniciadores LITSR: 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' (El Tai et al., 2000, Schonian et al., 2003). A reação foi preparada para um volume final de 25µL contendo 5 µL de DNA da amostra, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL do iniciador LITSR a 10mM, 1,25 µL do iniciador L5.8S a 10mM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 5U/ µL, 1,25 de DMSO e 12,25µL de H₂O destilada estéril. Após a preparação das amostras, a reação foi processada em termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 53°C por 60 seg e extensão a 72°C por 60 seg. A

extensão final foi a 72°C por 10 min. Em todas as reações de PCR foi incluído controle branco utilizando água destilada estéril e um dos controles positivos cepas referência: *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 técnica de eletroforese em gel foi utilizada para visualização dos produtos amplificados provenientes da PCR, em exposição à luz ultravioleta. Foi utilizado o gel de agarose na concentração de 2% corado com brometo de etídio e peso molecular de tamanho padrão 100 pb (DNA Step Ladder). As amostras consideradas positivas foram as que apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado de 300-350pb. Os produtos amplificados positivos na PCR-ITS1 foram submetidos à técnica de sequenciamento para a identificação da espécie de *Leishmania*.

As taxas de infecção natural foram calculadas segundo o critério de taxa mínima de infecção, quando se tratava de pools de indivíduos de uma mesma espécie (Paiva et al., 2007).

4.7 Métodos moleculares para o estudo da identificação do repasto sanguíneo das fêmeas alimentadas

4.7.1 Extração do DNA das fêmeas alimentadas

As fêmeas que apresentaram traços de sangue em seu abdômen foram dissecadas retirando-se a cabeça e a terminália (três últimos segmentos abdominais), montadas entre lâmina e lamínula em solução de Berlese e identificadas de acordo com classificação de Galati (2003). O restante do corpo foi colocado a seco em tubo de 1,5 mL estéril individualmente, para realização de extração de DNA pelo kit QIAamp® BLOOD (Qiagen, USA) conforme especificação do fabricante.

Na extração há uma grande chance de contaminação humana devido ao gene alvo utilizado. Com isso foi realizada a descontaminação da capela e de todos os instrumentos utilizados com hipoclorito de sódio a 1%. Todos os materiais utilizados como microtubos, ponteiras, etc. foram autoclavados e abertos dentro da capela. Os

profissionais que realizaram a extração utilizaram jaleco, touca, máscara e duas luvas para garantir a segurança no experimento. A extração foi realizada individualmente, ou seja, uma fêmea em cada tubo e como controle interno em todas as extrações, foram utilizados flebotômíneos machos de *Lu. longipalpis*.

Com o auxílio de agulha de insulina estéril, a fêmea foi lavada em duas soluções. Primeiro foi introduzida em hipoclorito de sódio a 2% e em seguida transferida para um tubo contendo água destilada estéril. Após este procedimento foi colocada em tubo seco e macerada com o auxílio do pistilo. Foram adicionados 200µl do buffer AL e 20µl de proteínase e foram vortexadas e incubadas a 56°C por 1 hora. Em seguida foi acrescentado 200 µl de etanol absoluto, vortexada, vertida na coluna e centrifugada por 1 min a 8.000 rpm. Foi trocado o fundo da coluna, adicionado 500 µl do buffer AW1 e centrifugado por 1 min a 8.000 rpm. O fundo da coluna foi trocado, acrescentado 500 µl do buffer AW2 e centrifugado por 3 min a 14.000 rpm. A coluna foi inserida no microtubo permanente, foram adicionados 20 µl do buffer AE no centro da coluna e após 5 min foi centrifugada por 2 min a 8.000 rpm e acrescentado mais 20 µl do buffer EB na coluna. Após 2 min de descanso foi centrifugado durante 3 min a 8.000 rpm e logo após as amostras foram armazenadas no freezer.

4.7.2 PCR dirigida ao gene do Citocromo b de vertebrados

A reação de PCR foi realizada com base na amplificação de um fragmento de 359 pb do gene do citocromo b (Cyt b) dos vertebrados com os iniciadores *cytb1*: 5' - CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e *cytb2*: 5'- GCCCCTCAGAATGATATT TGCCTCA-3', que amplificam um fragmento de 359pb. A reação foi preparada para um volume final de 25µL, contendo 5 µL de DNA da amostra, 2,5 µL da solução tampão 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix a 10mM, 1,25 µL do iniciador Cytb1 a 10mM, 1,25 µl do iniciador Cytb2 a 10mM, 0,10 µL de Taq DNA polimerase a 5U/ µL, 1,25 de DMSO e 12,40µL de H₂O destilada estéril. Após a preparação das amostras, a reação foi processada em termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 35

repetições de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 52°C por 30 seg, extensão de 72°C por 45 seg e extensão final a 72° C por 5 min.

Em todas as reações de PCR foi incluído como controle positivo DNA extraído de baço do marsupial *Didelphis albiventris* e para controle negativo foi utilizado DNA extraído de flebotomíneo macho.

A técnica de eletroforese em gel, foi utilizada para visualização dos produtos amplificados provenientes da PCR, em exposição à luz ultravioleta. Foi utilizado o gel de agarose na concentração de 2% corado com brometo de etídio e peso molecular de 100 pb (DNA Step Ladder). As amostras consideradas positivas foram as que apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado de 359 pb. Os produtos amplificados positivos foram submetidos à técnica de sequenciamento para a identificação da espécie de vertebrado.

4.8 Sequenciamento, edição e alinhamento das sequências

Após a realização da PCR, todas as amostras que amplificaram tanto o Cyt b quanto o ITS 1 foram submetidas a técnica de sequenciamento pela plataforma do IRR, onde realizaram todo o processamento das amostras.

As análises das sequências foram feitas nos softwares Seqtrace (Stuky, 2012) e MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). O resultado das análises foi comparado com sequências depositadas no banco de dados GenBank para avaliação da identidade, através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool - BLAST®. A identificação das espécies foi considerada quando as sequências exibidas apresentaram mais de 96% de identidade.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo da fauna de flebotomíneos

No período de maio de 2015 a abril de 2016 foram coletados 12.728 flebotomíneos em Pains, sendo 2.854 fêmeas (22,42%) e 9.874 machos (77,58%) (Tabela 2), pertencentes a dez gêneros distribuídos em 20 espécies sendo elas *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942), *Evandromyia bourrouli* (Barreto & Coutinho, 1941), *Ev. cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Ev. edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Ev. lenti* (Mangabeira, 1938), *Ev. teratodes* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Ev. termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Expapillata firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lu. renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Ny. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pi. monticola* (Costa Lima, 1932), *Pi. pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927).

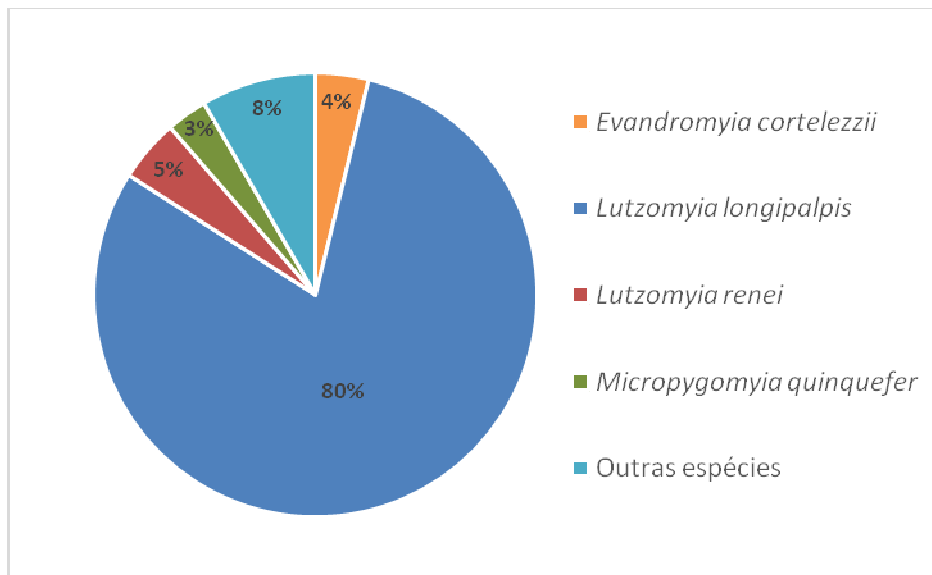
Tabela 2. Flebotomíneos coletados com armadilha CDC no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016

Flebotomíneos	Número de flebotomíneos coletados			
	Macho	Fêmea	Total	%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	14	-	14	0,10
<i>Brumptomyia cunhai</i>	9	-	9	0,07
<i>Brumptomyia</i> spp.	-	15	15	0,12
<i>Evandromyia bourrouli</i>	6	-	6	0,05
<i>Evandromyia cortelezii</i>	190	300	490	3,85
<i>Evandromyia edwardsi</i>	74	103	177	1,39
<i>Evandromyia lenti</i>	14	21	35	0,27
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	1	1	0,01
<i>Evandromyia termitophila</i>	4	11	15	0,12
<i>Expapillata firmatoi</i>	115	53	168	1,32
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	8.623	1.590	10.213	80,24
<i>Lutzomyia renei</i>	259	321	580	4,56
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	187	192	379	2,98
<i>Migonemyia migonei</i>	161	93	254	2,00
<i>Nyssomyia neivai</i>	11	6	17	0,14
<i>Nyssomyia whitmani</i>	112	84	196	1,54
<i>Pintomyia fischeri</i>	3	-	3	0,02
<i>Pintomyia monticola</i>	9	19	28	0,22
<i>Pintomyia pessoai</i>	66	31	97	0,76
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	2	3	0,02
<i>Sciopemyia sordellii</i>	16	12	28	0,22
Total	9.874	2.854	12.728	-
%	77.58	22.42	100	100

Fonte: Elaborado pela autora

A espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* (80%), seguida por *Lu. renei* (5%), *Ev. cortelezii* (4%) e *Mi. quinquefer* (3%). As demais espécies somaram 8% dos flebotomíneos coletados (Gráfico 1).

Gráfico 1. Porcentagem das espécies de flebotomíneos coletadas na área urbana do município de Pains/MG no período de maio de 2015 a abril de 2016



Fonte: Elaborado pela autora

O gênero *Evandromyia* compreendeu o maior número de espécies (seis), em relação aos dez gêneros encontrados (Tabela 2).

De todas as fêmeas coletadas 2.433 foram submetidas à detecção do DNA de *Leishmania*, 249 ao estudo da fonte alimentar e 172 foram montadas para identificação.

O mês de abril de 2016 apresentou a maior abundância de espécimes coletados com 2.515, o que correspondeu a 19,75% do total dos flebotomíneos (Tabela 3), sendo que a espécie *Lu. longipalpis* foi o principal responsável pelo pico ocorrido neste mês com 2.045 exemplares coletados (81,31%), sendo 1.564 no ponto 12. O segundo mês de maior número de espécimes coletados foi o mês de dezembro de 2015 totalizando 1.376 (10,81%), também sendo *Lu. longipalpis* o responsável pelo pico. Já o mês com menor número de flebotomíneos coletados foi em maio de 2015 com 251 (1,97%) indivíduos. Cabe destacar que *Lu. longipalpis* foi a espécie mais abundante durante todos os meses de coleta (Tabela 3).

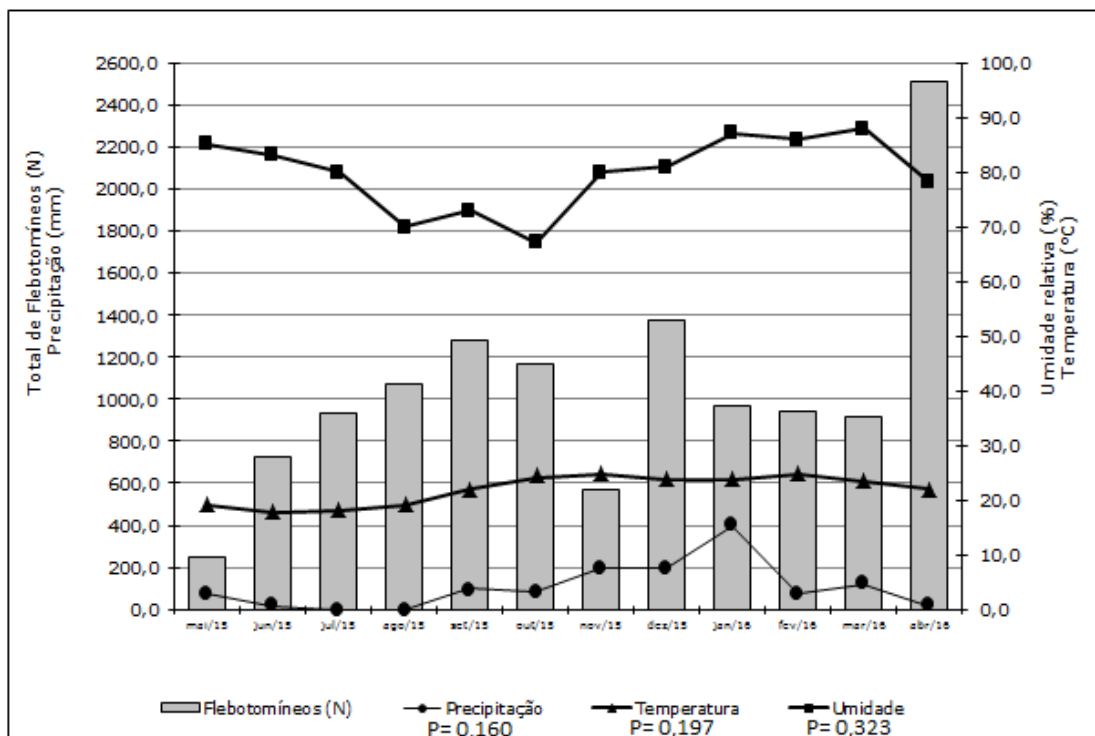
Tabela 3. Distribuição mensal dos flebotomíneos coletados em Pains/MG no período de maio de 2015 a abril de 2016

Flebotomíneo/Mês	mai/15	jun/15	jul/15	ago/15	set/15	out/15	nov/15	dez/15	jan/16	fev/16	mar/16	abr/16	Total	%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	-	1	-	1	7	-	-	4	-	-	1	14	0,10
<i>Brumptomyia cunhai</i>	-	-	-	-	-	8	1	-	-	-	-	-	9	0,07
<i>Brumptomyia sp</i>	-	1	-	-	-	3	6	1	2	-	-	2	15	0,12
<i>Evandromyia bourrouli</i>	-	-	-	-	-	2	1	-	-	2	1	-	6	0,05
<i>Evandromyia cortelezii</i>	23	34	24	19	33	38	36	53	48	56	40	86	490	3,85
<i>Evandromyia edwardsi</i>	2	3	13	7	10	21	16	29	12	21	23	20	177	1,39
<i>Evandromyia lenti</i>	-	1	-	-	-	2	5	11	6	3	5	2	35	0,27
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	0,01
<i>Evandromyia termitophila</i>	-	-	-	1	-	-	1	3	7	1	1	1	15	0,12
<i>Expapillata firmatoi</i>	3	1	13	71	15	6	3	9	23	14	5	5	168	1,32
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	182	620	816	869	1.115	963	327	1.123	765	674	714	2.045	10.213	80,24
<i>Lutzomyia renei</i>	9	42	25	37	70	35	80	35	30	54	28	135	580	4,56
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	6	2	7	-	-	8	42	79	21	79	69	66	379	2,98
<i>Migonemyia migonei</i>	5	2	8	31	27	25	22	9	33	23	19	50	254	2,00
<i>Nyssomyia neivai</i>	5	-	1	2	-	-	1	-	4	-	-	4	17	0,14
<i>Nyssomyia whitmani</i>	11	13	24	37	6	7	4	7	8	6	3	70	196	1,54
<i>Pintomyia fischeri</i>	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3	0,02
<i>Pintomyia monticola</i>	2	1	-	1	-	12	9	1	-	-	-	2	28	0,22
<i>Pintomyia pessoai</i>	1	2	1	-	6	30	13	10	8	6	2	18	97	0,76
<i>Psathyromyia lutziana</i>	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	3	0,02
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	2	1	-	1	1	-	5	-	3	5	8	28	0,22
Total	251	724	934	1.075	1.284	1.170	570	1.376	971	943	915	2.515	12.728	-
%	1,97	5,69	7,34	8,45	10,09	9,19	4,48	10,81	7,63	7,41	7,19	19,75	100	100

Fonte: Elaborado pela autora

Com relação aos parâmetros climáticos, as temperaturas médias variaram entre 17,7°C a 24,8°C e a umidade relativa do ar entre 67% a 88%. A pluviosidade apresentou uma maior variação com a mínima registrada no mês de agosto de 2015 (1,3 mm³) e a máxima em janeiro de 2016 (397,1 mm³). O teste qui-quadrado calculado, mostrou que não houve correlação entre as variáveis climáticas e a abundância dos flebotomíneos (Gráfico 2).

Gráfico 2. Relação das variáveis climáticas na abundância das espécies de flebotomíneos coletadas em Pains/MG de maio de 2015 a abril de 2016



Fonte: Elaborado pela autora

A tabela 4 apresenta os flebotomíneos coletados em cada ponto. O ponto 12 apresentou maior número de flebotomíneos coletados (3.957), seguida do ponto 3 (2.257) enquanto o ponto 8 obteve o menor número (6).

Quanto às espécies de flebotomíneos, *Lu. longipalpis* foi a espécie mais abundante, em praticamente todos os pontos. O ponto 13 foi o único que não foi coletado esta espécie.

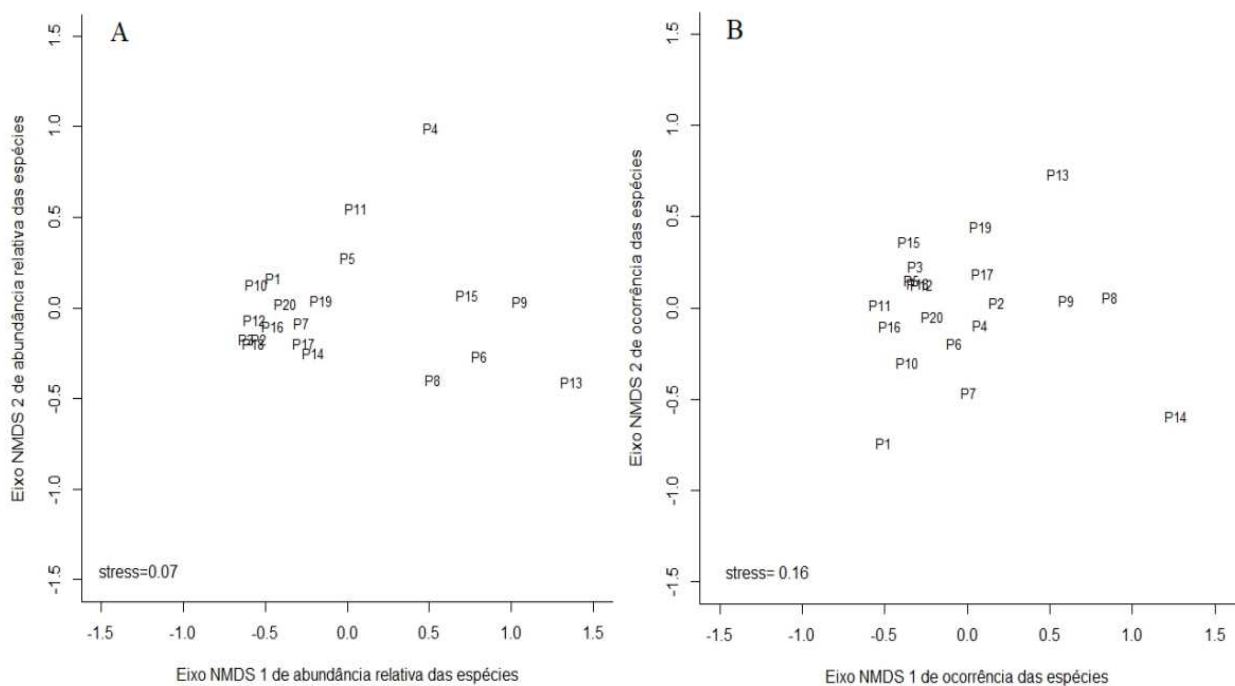
Tabela 4. Total de flebotomíneos coletados no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016, segundo os pontos de coleta

Flebotomíneos/Ponto	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	Total	%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	-	3	-	6	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	2	-	-	14	0,1
<i>Brumptomyia cunhai</i>	-	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	1	-	9	0,07
<i>Brumptomyia spp.</i>	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	1	4	1	-	1	-	-	2	-	-	15	0,12
<i>Evandromyia bourrouli</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0,05
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	8	26	45	8	35	40	10	2	8	10	67	56	6	2	9	25	46	36	5	46	490	3,85
<i>Evandromyia edwadi</i>	8	15	7	15	22	1	2	-	1	2	91	7	-	-	-	-	1	2	1	2	177	1,39
<i>Evandromyia lenti</i>	-	-	2	-	1	3	4	1	-	-	3	6	1	-	1	-	2	6	2	3	35	0,27
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,01
<i>Evandromyia termitophila</i>	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1	3	4	15	0,12
<i>Expapillata firmatoi</i>	92	2	13	4	17	2	2	-	-	11	6	10	-	-	1	6	-	1	-	1	168	1,32
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	7	610	2.152	13	187	17	63	2	2	808	423	3.431	-	6	6	329	187	1.417	28	525	10.213	80,24
<i>Lutzomyia renei</i>	-	-	8	18	7	1	2	-	-	162	67	284	-	-	-	8	1	1	-	21	580	4,56
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	4	9	2	23	7	-	-	-	2	74	139	43	-	-	3	3	1	7	1	61	379	2,98
<i>Migonemyia migonei</i>	-	-	9	-	50	-	-	-	-	2	133	18	-	-	1	1	-	24	-	16	254	2
<i>Nyssomyia neivai</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	5	8	-	-	-	-	1	1	-	1	17	0,14
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	2	5	1	26	1	-	1	1	1	62	54	1	-	3	6	6	17	1	7	196	1,54
<i>Pintomyia fischeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,02
<i>Pintomyia monticola</i>	-	-	-	-	7	1	-	-	-	-	1	12	-	-	1	2	-	3	-	1	28	0,22
<i>Pintomyia pessoai</i>	-	1	2	-	22	1	-	-	-	-	48	15	-	-	1	4	1	-	2	-	97	0,76
<i>Psathyromyia lutziana</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	0,02
<i>Sciopemyia sordellii</i>	-	1	-	-	2	5	1	-	-	1	-	6	-	-	-	2	-	4	2	4	28	0,22
Total	122	666	2.257	83	394	75	85	6	14	1.071	1.054	3.957	10	8	27	387	247	1.526	47	692	12.728	-
%	0,95	5,23	17,73	0,65	3,1	0,59	0,67	0,05	0,12	8,41	8,29	31,08	0,07	0,06	0,22	3,04	1,94	11,99	0,4	5,44	100	100

Fonte: Elaborado pela autora

O NMDS calculado com os dados de abundância relativa das espécies de flebotomíneos e com os dados de presença e ausência das espécies entre os diferentes pontos da área urbana de Pains, explicaram 96% e 77% da variação dos dados nos dois eixos, respectivamente. Os testes de permutação mostraram que houve similaridade na abundância relativa (A) e na ocorrência (B) das espécies de flebotomíneos entre os diferentes pontos amostrados na área urbana de Pains (PERMANOVA: $F=0,332$; $R^2=0,018$; $P=0,811$ e $F=0,720$; $R^2=0,038$; $P=0,685$, respectivamente) (Figura 7).

Figura 7. Escalonamento multidimensional Não Métrico (NMDS) a partir de uma matriz de dissimilaridade calculada com os índices de Bray-Curtis (A) e Jaccard (B) utilizando os valores de abundância relativa e presença e ausência das espécies de flebotomíneos entre os diferentes pontos amostrados na área urbana de Pains/MG



Fonte: Elaborado por Aldenise Campos

5.2 Detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos

As fêmeas não alimentadas foram destinadas à pesquisa de DNA de *Leishmania* por meio das técnicas de biologia molecular. O total de 2.433 fêmeas foram analisadas individualmente ou em pools. Um total de sete pools foram

positivos para *Leishmania*, sendo três pools da espécie *Lu. longipalpis*, dois de *Lu. renei*, um de *Ev. cortelezzii* e de *Ex. firmatoi*. A taxa de infecção obtida para *Leishmania* foi de 0,37% (Tabela 5).

Foram encontradas fêmeas infectadas nos pontos 1, 2, 3, 11, 12, 16 e 18. A espécie *Lu. longipalpis* foi detectada com *Le. braziliensis* e *Le. infantum*. *Lutzomyia renei*, *Ev. cortelezzii* e *Ex. firmatoi* foram detectadas com *Le. infantum*. Já a espécie *Mi. quinquefer* foi detectada com *Le. braziliensis* e *Pi. monticola* não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* (Tabela 6).

Tabela 5. Fêmeas de flebotomíneos analisadas e taxa de infecção no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016

Flebotomíneo	Fêmeas utilizadas no estudo da detecção do DNA de <i>Leishmania</i>	Positivas		Taxa de Infecção (%)
		Individual	Pool	
<i>Brumptomyia</i> spp.	12	-	-	-
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	270	-	1	0,37
<i>Evandromyia edwardsi</i>	98	-	-	-
<i>Evandromyia lenti</i>	20	-	-	-
<i>Evandromyia teratodes</i>	1	-	-	-
<i>Evandromyia termitophila</i>	10	-	-	-
<i>Expapillata firmatoi</i>	58	-	1	1,72
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1.395	-	3	0,21
<i>Lutzomyia renei</i>	194	-	2	1,03
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	173	1	-	0,58
<i>Migonemyia migonei</i>	78	-	-	-
<i>Nyssomyia neivai</i>	3	-	-	-
<i>Nyssomyia whitmani</i>	76	-	-	-
<i>Pintomyia monticola</i>	6	1	-	16,67
<i>Pintomyia pessoai</i>	26	-	-	-
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	-	-	-
<i>Sciopemyia sordellii</i>	11	-	-	-
Total	2.433	2	7	0,37

*O pool foi considerado como uma amostra independente do número de fêmeas contido no tubo

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 6. Detecção de DNA e identificação de espécies de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016

Flebotomíneo	Ponto de coleta	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania sp.</i>
<i>Evandromyia cortelezii</i>	12	-	1	-
<i>Expapillata firmatoi</i>	16	-	1	-
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3	-	1	-
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12	1	-	-
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	18	1	-	-
<i>Lutzomyia renei</i>	1	-	1	-
<i>Lutzomyia renei</i>	11	-	1	-
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	1	-	-
<i>Pintomyia monticola</i>	18	-	-	1
Total	-	3	5	1

Fonte: Elaborado pela autora

5.3 Identificação da fonte alimentar das fêmeas de flebotomíneos

No período do estudo, de maio de 2015 a abril de 2016 foram coletadas 249 fêmeas alimentadas, pertencentes a sete gêneros e oito espécies, sendo elas: *Ev. cortelezzii*, *Ex. firmatoi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. renei*, *Mi. quinquefer*, *Mg. migonei*, *Ny. whitmani* e *Pi. pessoai* (Tabela 7).

Tabela 7. Fêmeas de flebotomíneos coletadas alimentadas no município de Pains/MG, no período de maio de 2015 a abril de 2016

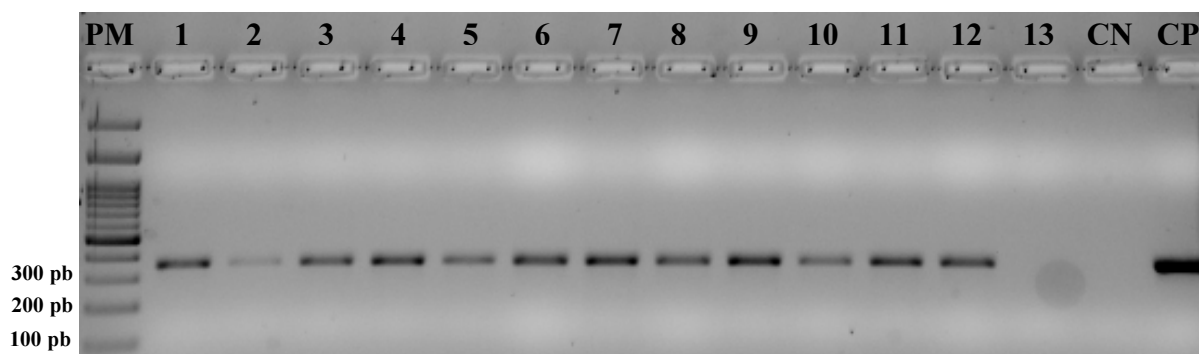
Flebotomíneo	Número de fêmeas alimentadas	%
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	5	2
<i>Expapillata firmatoi</i>	4	2
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	133	53
<i>Lutzomyia renei</i>	95	38
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	1
<i>Migonemyia migonei</i>	4	2
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2	1
<i>Pintomyia pessoai</i>	4	1
Total	249	100

Fonte: Elaborado pela autora

As espécies de fêmeas alimentadas mais abundantes foram *Lu. longipalpis* (53%), seguida de *Lu. renei* (38%) e as demais espécies somaram 9% (Tabela 7).

A amplificação de um fragmento que codifica uma sequência de 359 pb do gene Cyt b, produziu o produto de amplificação esperado em 142 fêmeas de flebotomíneos (57%), do total de 249 fêmeas analisadas (Figura 8).

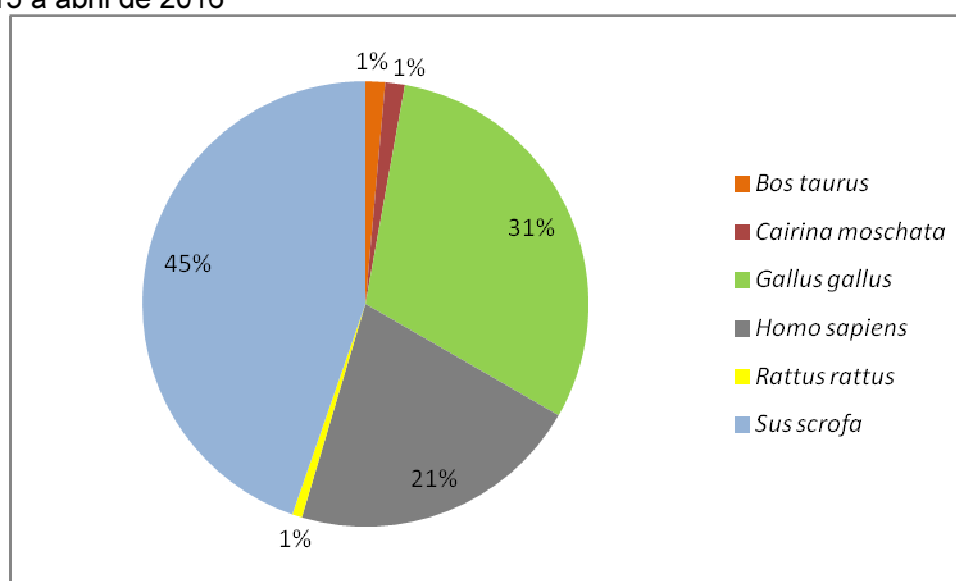
Figura 8. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os produtos amplificados da PCR do Cyt b a partir da extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos individuais coletadas na área urbana de Pains/MG



Canaletas: PM – Peso molecular 100pb; 1 a 12 - Fêmeas de flebotomíneos coletadas com sinais de sangue no abdômen; 13 – Macho de *Lu. longipalpis* (controle negativo interno); CN – Controle negativo (reagentes da PCR sem DNA); CP – Controle positivo (DNA extraído de baço do marsupial *Didelphis albiventris*).

O resultado do sequenciamento a partir da amplificação do gene do Cyt b mostrou que as fêmeas se alimentaram em seis hospedeiros vertebrados: *Bos taurus* (boi) (1%), *Cairina moschata* (pato) (1%), *Gallus gallus* (galinha) (31%), *Homo sapiens* (humano) (21%), *Rattus rattus* (rato) (1%) e *Sus scrofa* (porco) (45%) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Porcentagem dos hospedeiros vertebrados identificados como fonte alimentar para fêmeas de flebotomíneos coletadas no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016



Fonte: Elaborado pela autora

Foram encontradas quatro espécies de flebotomíneos com sinais de ingurgitamento em *Gallus gallus* (*Lu. longipalpis*, *Lu. renei*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai*) e *Homo sapiens* (*Lu. longipalpis*, *Lu. renei*, *Mi. quinquefer* e *Pi. pessoai*), três em *Sus scrofa* (*Ex. firmatoi*, *Lu. longipalpis* e *Lu. renei*), duas em *Bos taurus* (*Lu. renei* e *Pi. pessoai*) e uma em *Cairina moschata* (*Lu. longipalpis*) e *Rattus rattus* (*Ev. cortelezzi*) (Tabela 8).

5.4 Mapeamento das áreas de risco das leishmanioses

Após todas as análises realizadas foi confeccionado o mapa de risco das leishmanioses no município. A figura 9 apresenta a distribuição de *Lu. longipalpis* (principal vetor da *Le. infantum*) (A) e das espécies potenciais vetoras (espécies que apresentaram indivíduos com DNA de *Leishmania* no estudo) (B). É possível notar que essas espécies possuem a mesma distribuição, estando dispersas por todo o município, possuindo uma maior abundância nos pontos limítrofes da zona urbana, caracterizados como áreas de transição urbana/rural/silvestre. Em contrapartida, o centro obteve um menor número de flebotomíneos coletados.

Na figura 10 podemos observar que os cães positivos de outro trabalho realizado em Pains (dados não publicados), estão distribuídos próximos aos pontos onde foram encontradas fêmeas infectadas por *Leishmania* spp. (Tabela 6). Os casos humanos também se mostraram bem distribuídos pelo município, estando a maioria próximos aos pontos onde apresentaram flebotomíneos infectados. Ainda é possível visualizar no ponto 16 a associação de casos humanos de LV com casos caninos e a presença da espécie *Ex. firmatoi* com DNA de *Le. infantum*.

Podemos observar as regiões prioritárias do município (destacadas em laranja e vermelho) (Figura 10) para dar início ao programa de controle das leishmanioses, pois são locais mais vulneráveis para a transmissão segundo a densidade de Kernel, devido à alta densidade de flebotomíneos infectados. Além disso, podemos observar nestas áreas a presença de cães infectados, abundância de potenciais vetoras e flebotomíneos se alimentando em animais no peridomicílio (Tabela 8).

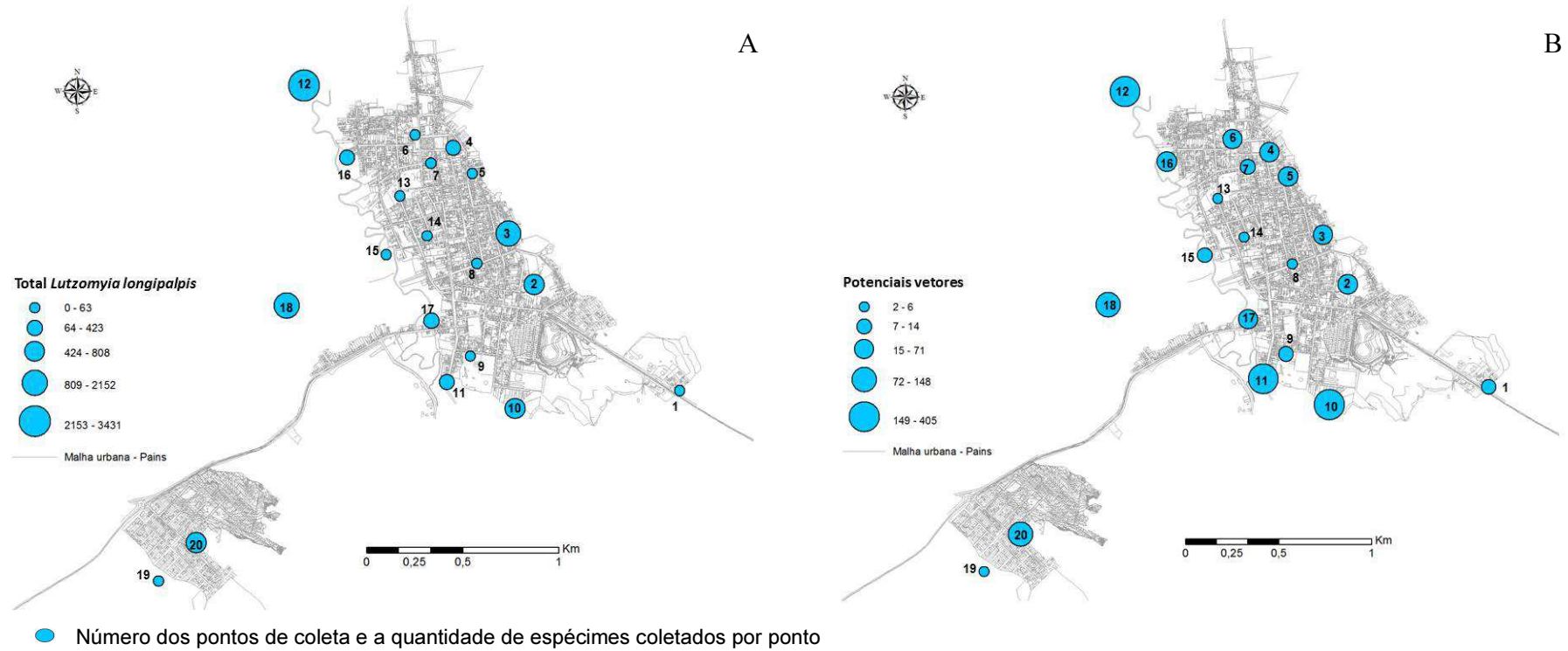
Tabela 8. Fontes alimentares das fêmeas coletadas no município de Pains/MG no período de maio 2015 a abril de 2016

Flebotomíneo	Total de fêmeas alimentadas	Total de identificação da fonte alimentar	Fontes alimentares					
			<i>Bos taurus</i>	<i>Cairina moschata</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Sus scrofa</i>
<i>Evandromyia cortelezii</i>	5	1	-	-	-	-	1 ¹⁶	-
<i>Expapillata firmatoi</i>	4	1	-	-	-	-	-	1 ¹²
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	133	65	-	2 ¹¹	33 ^{3, 5, 7, 10, 11, 12, 16, 18}	24 ^{3, 4, 10, 11, 12, 16, 17, 18}	-	6 ^{12, 16}
<i>Lutzomyia renei</i>	95	69	2 ¹²	-	7 ^{10, 16}	4 ^{10, 12}	-	56 ¹²
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	2	1	-	-	-	1 ¹⁰	-	-
<i>Migonemyia migonei</i>	4	2	-	-	2 ⁵	-	-	-
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pintomyia pessoai</i>	4	3	1 ⁵	-	1 ¹¹	1 ¹¹	-	-
Total	249	142	3	2	43	30	1	63

^{3,4,5,7,10,11,12,16,17,18} Número dos pontos de coleta onde as armadilhas foram instaladas

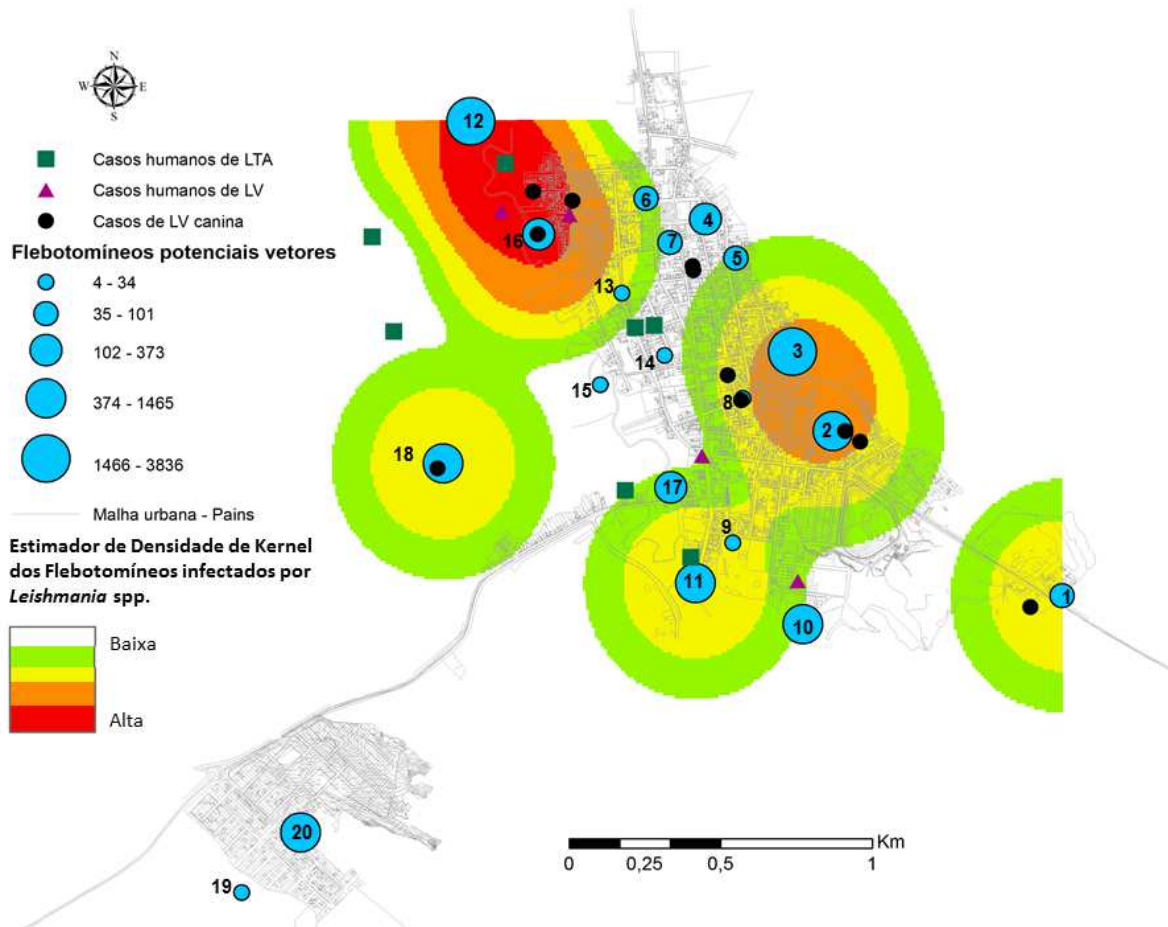
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 9. Distribuição de *Lutzomyia longipalpis* e das espécies potenciais vetoras do município de Pains/MG



Fonte: Elaborado por Felipe Rêgo

Figura 10. Densidade de Kernel dos flebotomíneos infectados, localização das potenciais espécies vetoras, dos casos de LV canina e casos humanos de LV e LTA do município de Pains/MG



Fonte: Elaborado por Felipe Rêgo (modificado)

6 DISCUSSÃO

6.1 A fauna flebotomínica e sua infecção por *Leishmania*

A fauna de flebotomíneos encontrada na região urbana de Pains foi diversa e abundante com algumas espécies incriminadas na transmissão dos agentes etiológicos da LT (*Mg. migonei*, *Ny. neivai* e *Ny. whitmani*) e LV (*Lu. longipalpis*) e outras que ainda precisam ter seu papel epidemiológico esclarecido. Foi observada também uma alta similaridade na comunidade de flebotomíneos quando analisada a abundância relativa e a ocorrência das espécies entre todos os pontos amostrados. A similaridade encontrada na comunidade de flebotomíneos entre os pontos de coleta pode ser devido à semelhança das características ambientais entre os locais, visto que eles possuem presença de animais domésticos e sinantrópicos (observação de outros projetos em andamento), árvores frutíferas e acúmulo de matéria orgânica, ambientes favoráveis para a manutenção dos flebotomíneos.

Os resultados das coletas sistematizadas mostram que os flebotomíneos estão bem distribuídos por toda a área urbana do município de Pains, e isso é preocupante, uma vez que foi encontrada no presente estudo espécies de flebotomíneos com DNA de *Leishmania*, agente causador das leishmanioses, além de fêmeas alimentadas com sangue de vários hospedeiros, como boi, galinha, entre outros. Neste caso, pode-se inferir que estes insetos estão adaptados ao ambiente antropizado e envolvidos com animais de criação, frequentemente encontrados nas residências que compõe a zona urbana do município de Pains, o qual está ainda representado por características ruralizadas, que possivelmente estão contribuindo para atração e adaptação dos flebotomíneos.

A espécie *Lu. longipalpis* foi predominante durante todo o estudo sendo encontrada infectada por *Le. infantum* e *Le. braziliensis*, corroborando com diversos autores (da Silva et al., 1990; Gontijo et al., 1995; Monteiro et al., 2005; Barbosa et al., 2006; Paiva et al., 2006; Dias et al., 2007; Paiva et al., 2010; Rêgo et al., 2015; Sanguinette, 2015). Estes achados reforçam os inúmeros relatos da importância epidemiológica desta espécie principalmente na transmissão de *Le. infantum* no Brasil (Deane, 1956; Killick-Kendrick, 1990; Lainson & Shaw 1979, 1998). Apesar de não ser um vetor comprovado de *Le. braziliensis*, seu encontro com o DNA deste parasito chama atenção para a possibilidade de envolvimento desta espécie no ciclo

epidemiológico da LTA no município de Pains. Ainda assim, não se pode incriminá-la como espécie vetora de *Le. braziliensis*, tendo em vista apenas achados moleculares, e principalmente, pela presença de uma das principais espécies envolvidas no ciclo epidemiológico da LTA, *Ny. whitmani*. Esta última espécie está distribuída em diversas regiões do Brasil, principalmente em regiões endêmicas do sudeste do país, se mostrando adaptada a diversos ambientes, principalmente ao peridomicílio (Luz et al, 2000; Camargo-Neves et al., 2002; Costa et al., 2007; Virgens et al., 2008, Brazil et al., 2015).

Foi possível observar que *Lu. longipalpis* esteve presente em praticamente todos os pontos de coleta. Apenas no ponto 13 (área central, ao lado do hospital municipal) não foi coletada esta espécie. Sua abundância no peridomicílio comprova sua adaptação a este ambiente e em locais propícios encontrados nos pontos de coleta, como a presença de rochas calcárias, vegetação, acúmulo de matéria orgânica no solo que podem servir de abrigo e/ou criadouro, além da criação de animais domésticos (galinha, porco, gado, entre outros) que servem de fonte alimentar (Foratini 1960; Sherlock & Guitton, 1969; Guerra et al., 2004; Barata et al., 2005; Macedo-Silva et al., 2014; Salomón et al., 2015). Seu comportamento oportunista já foi verificado por diversos autores e constitui um aspecto ecológico de grande relevância (Morrison et al., 1993; Barata et al., 2005).

Além disso, foi possível observar que o número total de machos foi maior que o de fêmeas. Este achado, apesar de não muito relevante e conciso nos diversos trabalhos faunísticos sobre estes insetos, corrobora com a maioria dos achados na literatura, onde geralmente, a presença de machos é predominante em relação às fêmeas (Loiola et al., 2007; Almeida et al., 2010). Esse fator já foi observado e pode ser explicado principalmente para a espécie *Lu. longipalpis*, pelo seu comportamento em formar agregados (Leks), atraindo machos e fêmeas ao local do hospedeiro com o objetivo da fecundação (Feliciangeli, 1987; Dye et al. 1991; Dias et al., 2007). Outros autores também apontam que a armadilha luminosa pode atrair de maneiras diferentes ambos os sexos, favorecendo a captura de machos, devido às fêmeas após o repasto retornarem aos seus abrigos (Barretto, 1943; Aguiar et al., 1985).

No presente trabalho foram encontradas também espécies que não são vetoras comprovadas de espécies de *Leishmania*, mas que têm sido relatadas com DNA de *Leishmania* em diversos estudos. A espécie *Lu. renei* foi encontrada em

abundância em um estudo realizado nas cavernas de Pains (Campos et al., 2017) e está presente em diversos municípios de Minas Gerais (Barata et al., 2008; Rêgo et al., 2015; Saraiva et al., 2015). Coelho e Falcão (1962) demonstraram em condições de laboratório *Lu. renei* transmitindo *Le. mexicana*. Mais tarde, Coelho et al. (1967) e Gontijo et al. (1987) também mostraram experimentalmente sua infecção por *Leishmania* sp.. Em um estudo realizado no norte de Minas Gerais Rêgo et al. (2015) a encontraram naturalmente infectada com DNA de *Leishmania* sp. e *Le. guyanensis*, porém em nosso estudo ocorreu o primeiro relato desta espécie com *Le. infantum*, sendo necessário mais estudos para ter seu papel epidemiológico esclarecido.

Outras espécies também foram encontradas com DNA de *Leishmania*. *Expapillata firmatoi* e *Ev. cortelezzii* foram encontradas com *Le. infantum* corroborando com outros trabalhos (Souza et al., 2003; Carvalho et al., 2008; Silva et al., 2008; Diniz et al., 2014; Donalisio et al., 2017) e *Mi. quinquefer* com *Le. braziliensis* (Paiva et al., 2010). Margonari et al. (2010) encontraram em Minas Gerais, *Pi. monticola* com DNA de *Le. braziliensis*, porém em nosso estudo não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* presente, permanecendo sua identificação até gênero (*Leishmania* sp.).

Esses achados mostram a importância dessas espécies no ponto de vista epidemiológico, uma vez que vem sendo encontradas com certa frequência no ambiente urbano. Apesar da presença do DNA de *Leishmania* na fêmea de flebotomíneo não ser suficiente para incriminar uma espécie como vetora, é uma condição que deve ser considerada, juntamente com o fato dela ser antropofílica. Estes insetos provavelmente alimentaram-se em hospedeiros susceptíveis e embora tenham sido encontrados infectados não significa que sejam capazes de transmitir o parasito aos seres humanos (Killick-Kendrick, 1990; Lainson & Shaw, 1988).

No trabalho foram encontradas também espécies de importância médica como *Ny. whitmani*, *Ny. neivai* e *Mg. migonei*. Apesar de neste estudo não terem sido encontradas infectadas, estão envolvidas no ciclo de transmissão das leishmanioses em diversas regiões das Américas (Camargo-Neves et al., 2002; Souza et al., 2003; Pita-Pereira et al., 2005; Costa et al., 2007; Andrade-Filho et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Virgens et al., 2008; Saraiva et al., 2009; Margonari et al., 2010; Saraiva et al., 2010, Carvalho et al., 2010; Salomon et al., 2010; Neitzke-

Abreu et al., 2014; Moya et al., 2015; Brazil et al., 2015), não podendo descartar a possibilidade de terem alguma importância epidemiológica no município.

No estudo foram encontrados flebotomíneos positivos para a presença de DNA de *Le. infantum*, *Le. braziliensis* e *Leishmania* sp., conferindo uma taxa de infecção de 0,37%. Esta taxa está de acordo com relatos da literatura onde as taxas de infecção nas áreas endêmicas variam em torno de 0,2 a 2,0% (Rodriguez et al., 1999; Luz et al., 2000; Miranda et al., 2002; Gontijo et al., 2005; Silva et al., 2007; Michalsky et al., 2011).

A taxa de infecção encontrada corrobora com o baixo número de casos humanos no município, porém esta é suficiente para a manutenção da endemicidade da infecção (Miranda et al., 2002; Cardoso et al., 2009). Além disso, cabe destacar que *Lu. longipalpis*, principal vetor de *Le. infantum* foi a espécie mais abundante durante todo o estudo, além da presença de importantes espécies, inclusive com DNA de *Leishmania* spp. tornando-se um fator de risco.

Podemos hipotetizar que esta sua elevada abundância com baixa infecção pode estar ligado a fatores genéticos e fisiológicos. Diversos estudos têm considerado que *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies crípticas, tendo variações genéticas dentro das populações, como diferenças no número de manchas e sua localização nos tergitos abdominais, além de alterações comportamentais, moleculares, bioquímicas, entre outras, podendo influenciar na sua capacidade vetorial (Mangabeira O., 1969; Ward et al., 1985; Hamilton et al., 1996; Uribe, Sandra 1999; Lainson & Rangel, 2005). No presente trabalho foi coletado *Lu. longipalpis* com uma mancha, porém este achado não foi aprofundado, sendo necessário mais estudos para avaliar se esta característica pode influenciar na capacidade vetorial da população desta espécie encontrada em Pains. Além desta característica, foi observada uma elevada variação morfométrica dos machos dessa espécie, sendo que alguns exemplares apresentavam tamanho bem menor que o padrão para a espécie.

É importante citar também que este trabalho faz parte de um projeto maior onde envolveu um estudo mais completo no município, incluindo o inquérito canino, apresentando 8,2% de positividade para *Le. infantum* (dados não publicados). O inquérito canino e o levantamento da fauna flebotomínica nas áreas endêmicas são de grande relevância, uma vez que as taxas de prevalência canina altas e a

presença predominante de espécies vetoras, resultam em elevado risco de transmissão para o homem (Vieira & Coelho, 1998).

Foi possível observar que apesar das diferenças na abundância dos flebotomíneos em cada ponto, eles estão distribuídos por todo o município, inclusive as possíveis espécies vetoras. Apesar desta distribuição, a zona periférica foi onde apresentou uma característica epidemiológica relevante. Este local possui uma característica peculiar que é a presença de formações rochosas que circundam o município, além de casas com características rurais. Podemos inferir que é onde, possivelmente, o ciclo de transmissão esteja ocorrendo, visto que as áreas de maior concentração de flebotomíneos são as mesmas onde aconteceu a maioria dos casos caninos e humanos da doença.

A conservação destas áreas é de grande importância, principalmente para evitar a expansão da doença para os centros urbanos. Condições ambientais mudando rapidamente causadas pela urbanização e desmatamento, principalmente causado pela mineração, altera o ecossistema local tendo uma grande influência na população de vetores, reservatórios e conseqüentemente na transmissão de doenças (Bejarano et al., 2002; Takken et al., 2003; Patz et al., 2004).

6.2 Variáveis climáticas X Abundância dos flebotomíneos

A interferência de fatores climáticos sob a população de flebotomíneos tem sido estudada por diversos autores. De acordo com a literatura, variáveis como temperatura, umidade e pluviosidade, podem influenciar de modo variável a população de flebotomíneos. Rutledge & Ellenwood (1975) sugerem que a sazonalidade dos flebotomíneos está relacionada com os padrões de distribuição das chuvas que agem modificando as condições dos criadouros no solo. Normalmente, estes insetos são encontrados em altas densidades durante os meses quentes e úmidos (Souza et al., 2002; Saraiva et al., 2015) ou em meses mais secos, como observado por Zelédon e colaboradores (1984) em área da Costa Rica e Galati et al. (1996) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Nosso trabalho está em conformidade com estes estudos, onde todos os meses foram coletados flebotomíneos independente das variações de temperatura e umidade. Com isso, não foi encontrada correlação entre a densidade de flebotomíneos e a temperatura,

corroborando também com diversos estudos realizados em Minas Gerais (Barata et al. 2004; Souza et al., 2004; Rêgo et al., 2015; Tanure, 2015).

Alguns aspectos devem ser levados em consideração para obter uma boa análise, um deles é o tempo de estudo. Para fazer uma análise ideal é necessário realizar no mínimo dois anos de coletas para comparar os resultados diminuindo-se a margem de erros proporcionados por anos atípicos (Dias et al., 2007). Por isso, o número de coletas talvez não tenha sido suficiente para correlacionar as relações de temperatura, umidade e pluviosidade com o número de indivíduos coletados.

Além disso, outros fatores não estudados poderiam explicar a variação na quantidade de flebotomíneos coletados em cada mês, como a presença de hospedeiros, o tipo de vegetação ou até mesmo dos microclimas característicos de cada local de coleta, que podem ter sofrido alterações durante os meses. Todos estes fatores podem ter influenciado na distribuição da população de flebotomíneos ao longo do ano. Também é importante ressaltar que os dados climáticos foram obtidos de uma estação meteorológica de outro município próximo e não exatamente nos pontos de coleta, podendo interferir na correlação dos dados.

O mês de abril de 2016 apresentou a maior abundância de espécimes coletadas seguida do mês de dezembro de 2015. Esse fato pode ser devido aos altos índices pluviométricos de meses anteriores a estes. Oliveira et al. (2003) já haviam feito observações semelhantes na zona urbana de Campo Grande, coletando maior número de flebotomíneos em seguida aos meses que registraram maiores volumes de chuva, o que foi mostrado também em outros estudos no Ceará, Bahia e Minas Gerais (Deane, 1956; Sherlock e Guitton, 1969; Galati et al., 1996; Barata et al., 2004; Monteiro et al., 2005, Machado et al., 2012). Acredita-se também que o aumento da umidade relativa do ar após períodos de chuva favoreça o desenvolvimento das larvas dos flebotomíneos, consequentemente aumentando sua densidade (Forattini, 1973).

Além destes, outros fatores também podem estar envolvidos, visto que os picos encontrados no nosso estudo foram representados por pontos individuais, que elevaram o total de indivíduos coletados, principalmente em abril de 2016. Foi possível observar que o ponto 12 foi responsável pela maior abundância de flebotomíneos, principalmente de *Lu. longipalpis*. Já os meses de maio e novembro foram os meses de menor captura, podendo induzir que algum outro fator ambiental

tenha influenciado na baixa abundância dos flebotomíneos. Cabe aqui destacar que os habitat naturais dos flebotomíneos caracterizam-se por possuírem uma pequena variação na temperatura e umidade já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação. Sendo assim, uma pequena variação dos fatores climáticos é suficiente para alterar a dinâmica de suas populações (Dias et al., 2007).

Através das observações feitas podemos inferir que ocorreu um equilíbrio no número de flebotomíneos durante o ano com exceção dos meses atípicos citados, mostrando que os flebotomíneos estão bem adaptados ao peridomicílio e as características ambientais da região. Cabe citar que diversos pontos eram cercados por rochas calcárias e vegetação mantendo assim a umidade relativa do ar estável (Carvalho et al., 2013; Rêgo 2015), mesmo em meses mais secos garantindo o sucesso dos flebotomíneos, principalmente de *Lu. longipalpis* durante todo o ano.

6.3 Identificação da fonte alimentar das fêmeas de flebotomíneos

Nos flebotomíneos, a hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam do sangue para a maturação dos ovários. O caráter oportunista dos flebotomíneos no que diz respeito à alimentação sanguínea, revela uma grande variedade de vertebrados que podem funcionar como fonte alimentar como mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Ferreira, 1945; Dias et al., 2003).

O estudo do conteúdo estomacal de flebotomíneos é de grande significado ecológico e epidemiológico, porque permite descobrir a identidade dos hospedeiros vertebrados, serve como subsídio para a indicação de potenciais reservatórios de *Leishmania* e o papel que certos animais podem desempenhar em área de transmissão destes parasitas norteando as atividades de controle e vigilância (Pereira et al., 2008; de Ávila et al., 2018).

Diversos trabalhos tem demonstrado o sucesso de técnicas moleculares para identificar as fontes alimentares dos flebotomíneos. Porém, para o sucesso da técnica existem passos importantes que devem ser levados em consideração para obter êxito nos resultados (Carvalho et al., 2017). Precauções como garantir que o processo de extração de DNA nas fêmeas alimentadas seja estritamente livre de contaminação é um ponto crucial, uma vez que o primer utilizado (Cyt b) tem a

capacidade de identificar diversas espécies de vertebrados. Em todas as etapas os cuidados foram redobrados como descrito na metodologia.

Vários estudos têm utilizado o gene Cyt b como alvo para a detecção das fontes alimentares em flebotomíneos, apresentando taxas variáveis na identificação dos vertebrados (Abbasi et al., 2009; Quaresma et al., 2012 Soares et al., 2014). Em nosso estudo, o uso da técnica molecular permitiu a identificação da fonte alimentar em 57% das fêmeas consideradas ingurgitadas mostrando que a técnica foi satisfatória, uma vez que todas as identificações de vertebrados foram coerentes com os pontos de coleta dos flebotomíneos.

Um ponto importante, que pode explicar este percentual de identificação pode ser devido ao volume de sangue ingerido pelas mesmas (Rogers et al., 2002) e o tempo decorrido após a conclusão do repasto, como sugerido por Sant'Anna et al. (2008). Além disso, algumas fêmeas poderiam estar com ovos e/ou pouca quantidade de sangue em seu abdômen, o qual adquire uma coloração escura assemelhando-se a sangue, e dessa forma foi separada na triagem como fêmea alimentada com sangue.

Estes fatos podem ser justificados a partir do grande número de amostras negativas na PCR (43%), possivelmente devido à baixa quantidade de DNA extraído do hospedeiro vertebrado (Rogers et al., 2002). A técnica funcionou satisfatoriamente para as fêmeas que tinham um grande volume de sangue no abdômen. Esses resultados corroboram com os do estudo realizado por Carvalho et al. (2017) em casa branca onde houve 47% de amostras negativas e conseguiram identificar 53% das fontes alimentares utilizando a mesma técnica.

Como já mencionado, em praticamente todos os pontos de exposição das armadilhas apresentavam pelo menos uma criação de animal doméstico, como galinha, porco, boi, entre outros. A maioria das fêmeas analisadas alimentaram-se em *Sus scrofa*, seguida de *Gallus gallus*. Trabalhos realizados vêm mostrando que os flebotomíneos têm ingerido sangue desses animais corroborando com nossos estudos (Brazil et al., 1987; Silva et al., 2017; Gonzalez et al., 2018), sendo necessários estudos para conhecer melhor o seu papel na manutenção do ciclo das leishmanioses. Diversos autores têm discutido sobre a criação de animais no peridomicílio citando que os mesmos podem ser um fator de risco de transmissão nestes ambientes, uma vez que as espécies vetoras podem ser atraídas pelos

mesmos, podendo ainda alimentar-se em seres humanos (Corredor et al., 1989; Castellón & Domingos, 1990; Arias et al., 1996; Galati et al., 1996; Caldas et al. 2002; Moreira et al., 2003). Já outros, sustentam a ideia que podem ser um fator de proteção devido o flebotomíneo não precisar adentrar no intradomicílio para procurar fontes alimentares (Alexander et al., 2002; Teodoro et al., 2007).

As espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. renei* foram as que apresentaram o maior número de fêmeas alimentadas e também foram as espécies mais coletadas durante todo o estudo, mostrando que estão bem adaptadas ao ambiente peridomicíliar.

Lu. renei foi encontrada em abundância se alimentando em *Sus scrofa* no ponto 12. Cabe citar que próximo a este ponto possui um paredão de rochas, ambiente característico desta espécie (Saraiva et al, 2015; Campos et al., 2017), além de chiqueiro, demonstrando assim que *Lu. renei* é oportunista, alimentando-se também em boi, galinha e humanos.

A espécie *Lu. longipalpis* em sua maioria foi encontrada alimentando-se em *Gallus gallus*. Diversos estudos têm mostrado que esta espécie se alimenta frequentemente em galinhas, sendo coletado em grande quantidade próximo a galinheiros (Genaro et al., 1990; Barata et al., 2005; Missawa et al., 2008; Carvalho et al., 2017). Apesar das galinhas não atuarem como reservatórios mostram-se importantes na manutenção e domiciliação dos vetores, principalmente influenciando na densidade deles no peridomicílio (Teodoro et al, 1993; de Ávila et al, 2018). Assim como em outros trabalhos foi possível observar que *Lu. longipalpis* possui um comportamento alimentar eclético e oportunista (Macedo-Silva et al., 2014; Guimarães-e-Silva et al., 2017; Fonteles et al. 2018), alimentando-se também em porco, humano e pato.

Em nosso estudo não houve a identificação de fontes alimentares em cães. Segundo Paternina et al. (2016), os cães são menos atraentes aos flebotomíneos do que a presença de outros animais como o boi e porco, o que poderia explicar nossos resultados.

A espécie *Rattus rattus* foi identificada como fonte alimentar em um indivíduo da espécie *Ev. cortelezzii*. Sua presença está associada a entulhos, matéria orgânica e criação de animais, condições presentes em muitos pontos de coleta. Esta espécie de roedor é comum ao ambiente urbano, sendo encontrado no domicílio (Brandão-Filho et al., 2003; Quaresma et al., 2011), peridomicílio (Brandão-

Filho et al., 2003; Ferreira et al., 2015) e em outros ambientes (Brandão-Filho et al., 2003; Quaresma et al., 2011; Zanet et al., 2014; Ferreira et al., 2015). Devido a esta adaptabilidade, esta espécie de rato pode ser o elo entre ciclos de transmissão silvestre e peridoméstico da leishmaniose (Brandão-Filho et al., 2003; Andrade et al., 2015). Apesar de ser suspeita de reservatório para a *Leishmania*, tem sido encontrado com diversas espécies destes protozoários, inclusive *Le. braziliensis* e *Le. infantum* (Alencar et al., 1960, Brandão-Filho et al., 2003, Oliveira et al., 2005; Pereira, 2015).

Com base nos resultados podemos inferir que os animais presentes no peridomicílio estão desempenhando um importante papel como hospedeiros, contribuindo para a manutenção dos flebotomíneos neste ambiente. A espécie *Lu. longipalpis* principal vetora de *Le. infantum* está ocorrendo em abundância no ambiente peridomicíliar com a presença do DNA de *Leishmania* spp., alimentando-se em humanos e em diversos animais. Do mesmo modo, as espécies *Ev. cortelezzii*, *Ex. firmatoi*, *Lu. renei* e *Mi. quinquefer* foram encontradas com DNA de *Leishmania* spp. e alimentando-se de animais no peridomicílio, inclusive em humanos.

6.4 Mapeamento das áreas críticas e a possível situação do risco de transmissão das leishmanioses no município de Pains

O município de Pains durante alguns anos vem sofrendo com um grande impacto ambiental gerado pela urbanização, mineração e agricultura. Essas ações geram consequências ao ambiente refletindo na ecologia dos vetores e conseqüentemente na incidência de doenças (Takken et al., 2003; Patz et al., 2004).

A estimativa de Kernel é uma técnica estatística, de inferência espacial, não paramétrica, em que uma distribuição de pontos ou eventos é convertida em uma “superfície contínua de risco” (Silva, 2004). Esta técnica vem sendo utilizada em diversos estudos, desempenhando um papel importante no contexto epidemiológico (Gatrell et al. 1996).

No mapa foi possível visualizar que a maioria das espécies potenciais vetorais estão presentes nas zonas periféricas do município, podendo estar ligadas às áreas de vegetação e formações rochosas presentes nesta zona de transição da área

antropizada. Cabe enfatizar também que muitos pontos possuem ainda característica rural com a presença de animais de criação e vegetação, criando assim um habitat ideal para os flebotomíneos, tendo alimentação, abrigo e locais para sua reprodução. Dessa forma os insetos não necessitam adentrar aos domicílios, sugerindo uma adaptação maior ao peridomicílio, podendo ser hipoteticamente outro fator relacionado ao número de casos humanos registrados.

Apesar da taxa de infecção no município ter sido relativamente baixa (0,37%), não quer dizer que o mesmo está isento do risco de transmissão das leishmanioses. Pelo contrário, nossos estudos sugerem que há pelo menos duas espécies de *Leishmania* circulantes no município, além da presença de vetores e possíveis hospedeiros e reservatórios. Apesar do elevado número de *Lu. longipalpis* na área não se observa uma relação proporcional ao número de casos de LV. Provavelmente, isso se deve ao encontro de um baixo número de fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas, além de possíveis variações genéticas que podem influenciar em sua capacidade vetorial.

Uma série histórica dos casos humanos de leishmaniose entre os anos de 2002 e 2019 demonstram que os casos de LTA são mais frequentes (24) quando comparado com os casos de LV (8). Baseado nesse fato é possível inferir que *Lu. longipalpis* e/ou outras espécies encontradas com DNA de *Le. braziliensis* possam estar envolvidas no ciclo de LTA. Além disso, podemos observar que na zona periférica do município foram encontrados flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp., além do registro de cães infectados, dando a entender que as leishmanioses são mais ocorrentes nestas áreas limítrofes do ambiente urbano. É importante salientar a expansão desta parasitose para a área mais central do município, onde foram registrados casos humanos. Cabe chamar atenção para a área de risco representada em vermelho na figura 10, onde é possível observar alta densidade de flebotomíneos infectados pelo estimador de Kernel, além da associação com cães infectados e casos humanos de LV e LT.

Também é importante destacar que a infecção canina no município foi de 8,2%. Segundo o Ministério da saúde áreas com taxas de prevalência canina superiores a 2% são consideradas prioritárias para implantação das medidas de controle, sendo recomendado o inquérito canino censitário anual (Brasil, 2014). O cão é considerado o mais importante reservatório doméstico da LV por ser altamente

susceptível à infecção e por apresentar intenso parasitismo cutâneo e tem sido responsabilizado pelo surgimento e manutenção de focos endêmicos e epidêmicos da doença nos grandes centros urbanos principalmente devido a seu convívio junto ao homem (Dantas-Torres et al., 2006; Silva et al., 2001).

Os resultados mostram que o município de Pains apresenta todas as características necessárias para a expansão das leishmanioses, visceral e tegumentar, apontando para necessidade da implantação de medidas profiláticas adequadas a situação local. Pela primeira vez, foram esclarecidos os prováveis componentes epidemiológicos da transmissão no município e as áreas críticas para intervenção. As regiões prioritárias destacadas em laranja e vermelha no mapa de risco constituem áreas ideais para o início do programa de controle das leishmanioses no município, pois apontam quais são os locais mais vulneráveis para a transmissão das leishmanioses. Essas informações foram valiosas para um retorno do cenário atual da epidemiologia das leishmanioses para o município, mostrando a importância da implementação de um programa de controle e vigilância pelos órgãos competentes, a fim de prevenir este agravo e promover a saúde da população.

7 CONCLUSÕES

- Foi encontrada em Pains/MG uma fauna flebotomínica com 20 espécies pertencentes a dez gêneros.
- As espécies coletadas mostraram-se bem distribuídas entre os pontos destacando o potencial risco de transmissão de *Leishmania* no ambiente urbano, sendo os pontos críticos presentes principalmente na zona periférica do município com a presença de cães e flebotomíneos infectados.
- A espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* (80%) principal vetora de *Le. infantum* causadora da LV.
- As variáveis climáticas (temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar) não tiveram correlação com o número de flebotomíneos coletados e como *Lu. longipalpis* foi a espécie abundante em todos os meses, podemos dizer que a transmissão está sujeita a ocorrer em qualquer época do ano no município de Pains.
- A detecção de DNA de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* em *Lu. longipalpis* somado a abundância de espécimes coletados no peridomicílio, sugere a possível participação desta espécie na veiculação destes parasitos entre hospedeiros vertebrados, mas é necessário cautela no envolvimento desta espécie no ciclo de transmissão da LTA, tendo em vista apenas a detecção de DNA do parasito e a presença de espécies já incriminadas neste ciclo no município de Pains.
- O encontro do DNA de *Leishmania* em flebotomíneos que ainda não são vetores comprovados como *Ev. cortelezzii*, *Ex. firmatoi*, *Lu. renei*, *Mi. quinquefer* e *Pi. monticola*, indica a necessidade de estudos para elucidar o seu envolvimento no ciclo de transmissão no município.
- Além da espécie humana, as fêmeas de flebotomíneos se alimentaram em outras cinco espécies (boi, porco, galinha, pato e rato) mostrando que os flebotomíneos estão tendo um papel importante no peridomicílio, cada vez mais adaptados ao ambiente antropizado, com oportunidades de alimentação em animais de criação e aumentando as chances de contato com os seres humanos, o que pode representar maior risco de transmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. Identification of Blood Meals Imbided by Phlebotomine Sand Flies Using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**; v. 9, n. 1, p. 79-86, 2009.
- AGUIAR, G. M.; et al. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 80 (4):465-482, 1985.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GRIMALDI FILHO, G.; MOMEM, H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 1987.
- ALMEIDA, A. B. P. F. MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**; 40 (7), 1610-1615, 2010.
- ALVAR, J.; et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**; 7(5): e35671, 2012.
- ALENCAR, J. E.; PESSOA, E. P.; FONTENELE, Z.F. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceará. Brasil. **Rev Inst Med Trop**; 2(6): 347-348, 1960.
- ALEXANDER, B. et al. Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**; 8(12): 1480–1485, 2002..
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**; 26: 32–46, 2001.
- ANDRADE FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 481-487, 2007.
- ANDRADE, M. S.; et al. Infectiousness of sylvatic and synanthropic small rodents implicates a multi-host reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**; 9(10): e0004137, 2015.
- ANDRADE, A. J.; GURGEL-GONÇALVES, R. New record and update on the geographical distribution of *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America. **Check List**; vol. 11, p. 1566, 2015.

ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl Environ Microbiol**; 66:1933-8, 2000.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**; v. 2, p. 145-156, 1996.

ASHFORD, W.. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**; 14: 523-523, 1996.

BARATA, R. A.; et al. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 99: 481-487, 2004.

BARATA, R. A.; et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**; 38 (5):421-425, 2005.

BARATA, R. A.; ANTONINI, Y.; GONÇALVES, C. M.; COSTA, D. C.; DIAS, E. S. Flebotomíneos do Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, MG. **Neotrop Entomol**; 37: 226-228, 2008.

BARBOSA, A. F.; OLIVEIRA, S. M.; BERTHO, A. L.; FRANCO, A. M.; RANGEL, E. F.. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 101: 851-856, 2006.

BARRETTO, M. P. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). Doutorado [Tese de Livre-Docência em Medicina] – Universidade Federal de São Paulo, 1943.

BEJARANO, E. E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VÉLEZ, I. D. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 97(5):645-647, 2002.

BENICIO, E.; et al. Sustained Presence of Cutaneous Leishmaniasis in Urban Manaus, the Largest Human Settlement in the Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 93: 1208–1213, 2015.

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**; 97: 291–296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: **Editores do Ministério da Saúde**; 2014.

BRASIL. **Ministério das Minas e Energia**; Perfil da cal. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**; Brasília, DF, 8. ed., 2010.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral**; Vol. 35, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**; Brasília-DF, 2ª ed., 2017.

BRAZIL, R. P.; NASCIMENTO, M. D. S. B; MACAU, R. P.. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 82: 145, 1987.

BRAZIL R. P.; BRAZIL, B. G. BIONOMIA: Biologia de Flebotomíneos Neotropical. In Rangel EF, Lainson R, editors. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 257-74, 2003.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – A mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**; vol. 4, p. 1–4, 2015.

BRILHANTE, A. F.; et al. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**; vol. 68, n. 4, p. 927-930, 2016.

CABRERA O. L.; et al. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. **Biomedica**; 22 (3):296-302, 2002.

CALDAS, A. J. M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 96, p. 21-28, 2002.

CAMPOS, A. M.; et al. Photoperiod Differences in Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species Richness and Abundance in Caves in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**; 54(1), 100–105, 2017.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; DE GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 35, p. 299-306, 2002.

CARDOSO, P. G.; et al. Flebótomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 42(2):146-150, 2009.

CARVALHO, G. M. L.; et al. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**; 8: 407-414, 2008.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**; vol. 116, p. 108-110, 2010.

CARVALHO, G. M. L.; et al. Bloodmeal Identification in Field-Collected Sand Flies From Casa Branca, Brazil, Using the Cytochrome b PCR Method. **Journal of Medical Entomology**; 54(4), 1049–1054, 2017.

CASTELLÓN, E. G.; DOMINGOS, E. D. On the focus of kala-azar in the state of Roraima, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 86, n. 3, p. 375, 1990.

CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**; vol. 117, p. 13-21, 2007.

COELHO, M.V. & FALCÃO, A.R. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II–Transmissão de amostra *L. mexicana* por picada de *Phlebotomus longipalpis* e de *Phlebotomus renei*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 4, 220–224, 1962.

COELHO, M. V.; FALCÃO A.R. & FALCÃO, A.L. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em flebotomos brasileiros do gênero *Lutzomyia* França, 1924. IV–Ciclo vital de *L. donovani* em *L. longipalpis* e *L. renei*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 9, 361–366, 1967.

CONFALONIERI, U. E., MARGONARI, C., QUINTAO, A. F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Tropica**, 129, 33-41, 2013.

CORREDOR, A.; et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 40, p. 480-486, 1989.

COSTA, C. H. N., et al. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; 93: 464, 1999.

COSTA, S. M. et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes&Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 149-153, 2007.

COULSON, R. M. et al. Amplifications and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. **Medical Veterinary Entomology**; vol. 4, p. 357-366, 1990.

DA SILVA, A. L.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 85:453-458, 1990.

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

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**; vol. 149, p. 139-146, 2007.

DATASUS. **Tecnologia da Informação a Serviço do SUS**. Casos de LTA. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>; Acessado em 19 de novembro de 2018.

DATASUS. **Tecnologia da Informação a Serviço do SUS**. Casos de LV. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def>; Acessado em 19 de novembro de 2018.

DE ÁVILA et al. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**; 11:64, 2018.

DE SOUZA, R. L., 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. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**; 76(3):559-565, 2006.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. **Faculdade de Medicina**; Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**; 45: 419-421, 1954.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad Saúde Pública**; 19:1373-80, 2003.

DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 40; p. 49-52, 2007.

DINIZ, M. M. C. S. L.; et al.: Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites & Vectors**; 7:139, 2014.

DONALISIO, M. R.; et al. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of

phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. **PLoS Negl. Trop. Dis.**; 11(7): e0005666, 2017.

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

FELICIANGELI, M. D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela. III - Seasonal fluctuation. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**; 82: 167-176, 1987.

FERREIRA, F. S. C. A reação das precipitinas aplicadas aos dípteros do gênero *Phlebotomus*. **Anais do Instituto de Medicina Tropical**; 2:187-196, 1945.

FERREIRA, E. C.; et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Vet. Res.**, 2015.

FONTELES, R.S. et al. Detection of *Leishmania* DNA and Blood Meal Identification in Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Lençóis Maranhenses National Park Region, Brazil. **J. Med. Entomol.**; 55(2), 445-451, 2018.

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera:Psychodidae). **Faculdade de Higiene e Saúde Pública**, Universidade de São Paulo;. v. 25, p. 209-215, 1960.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae – Leishmanioses – Bartonelose. In **Entomologia Médica**; Edgard Blucher, São Paulo, 1973

FORATTINI, O. P. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**; São Paulo, 10: 31-43, 1976.

FREITAS-LIDANI, K. C.; MESSIAS-REASON, I. J.; ISHIKAWA, E. A. Y. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 109, p. 442-447, 2014.

GALATI, E. A. B.; et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saú Públ.**; 30: 115-128, 1996.

GALATI, E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 53-175, 2003.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In Rangel E, Lainson R eds, **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 23-175, 2003.

GENARO, O. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 23, p. 121, 1990.

GOMES, A. C.; NEVES, V. L. F. C. Estratégia e perspectiva de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 6: 553-58, 1998.

GATRELL, A. C.; BAILEY, T. C.; DIGGLE, P. J.; ROWLINGSON, B. S. Spatial point pattern analysis and its application in geographical epidemiology. **Trans. Inst. Br. Geogr.**; 21: 256-274; 1996.

GÓES, M. A. O.; JERALDO, V. L. S; OLIVEIRA, S. A. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. **Rev. Bras. Med. Fam.** Rio de Janeiro, Abr-Jun; 9 (31):119-126, 2014.

GONTIJO, C.M.F., COELHO, M.V., FALCÃO, A.R. & FALCÃO, A.L. The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 82 (3), 445, 1987.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**; 36 (1): 71-80, 2003.

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

GONTIJO, C. M. F.; FALCÃO, A. R.; FALCÃO, A. L.; COELHO, M. V. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 90: 367-73, 1995.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v. 7, p. 338-349, 2004.

GONTIJO, C. M. F.; et al. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Araçuaí, Minas Gerais state, Brazil. **Rev. Soc. Iberoam Inform. Cient (SIIC)**; 2005.

GONZALEZ, C.; et al. Diversity patterns, *Leishmania* DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. **PLoS ONE**; 13(1): e0190686, 2018.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**; v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 107, p. 664-674, 2012.

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**; 41:687-725, 1989.

GUERRA, J. A. O.; et al. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 37(4):305-11, 2004.

GUIMARÃES-E-SILVA, A.S. et al. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**; 12(8), 2017.

HAMILTON, J. C., et al. Comparison of the sex pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Costa Rica. **Ann Trop Med Parasitol**; 90: 535-541, 1996.

HAOUAS, N. et al. Development of a molecular tool for identification of *Leishmania* reservoir host by blood meal analysis in the vector. **A. M. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 77, p. 1054-1059, 2007.

HARRIS, E. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal Clinical Microbiology**; v. 36, p. 1989-1995, 1998.

HAUSERMANN, H. P.; et al. Contours of risk: spatializing human behaviors to understand disease dynamics in changing landscapes. **EcoHealth**; 9 (3), 251-255, 2012.

IBGE. **População de Pains.** Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/pains/panorama>. Acessado em 19 de novembro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Estação convencional de Bambuí, Minas Gerais.** Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesConvencionais>. Acessado em 15 de dezembro de 2018.

KENT, R.; NORRIS, D. E. Identification of Mammalian blood meal in mosquitoes by a multiplex by Polymerase Chain Reaction target cytochrome B. **Am. J. Medicine and Hygiene**; 73: 336-342, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**; v. 4, p. 1-24, 1990.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology Evolution**; v. 33, p. 1870-1874, 2016.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W, KILLICK-KENDRICK R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**; p. 1- 120, 1987.

LAINSON R, SHAW JJ. New World leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Baeows, M Sussman (eds). **Microbiology and Microbial Infections**; 5: 241-266, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox, JP Kreir, D Wakelin (eds). **Microbiology and Microbial Infections, Parasitology**; p.313-349, 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis with particular reference to Brazil - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**; v. 1, p. 13-32, 2010.

LANGERON, M. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris, 1949.

LIMA, W. G.; et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**; v. 92, p. 43-53, 2004.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 102, p. 581-585, 2007.

LUZ, B. E. et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasit.**; 94: 623-631, 2000.

MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal Medical Entomology**; v. 51, p. 237-244, 2014

MACHADO, T. O. et al. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquaruçú, state of Tocantins, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 107, p. 955-959, 2012.

MADEIRA, M. F.; et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitology Research**; v. 97, p. 73-76, 2005.

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

MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e Biologia dos Phlebotomus do Ceará. **Rev. Bras. Mal. D. Trop.**; 21:3-25, 1969.

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

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

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Publ.**; 10(2): 359-375, 1994.

MENEZES, Júlia Alves. Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais. **Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou**. Belo Horizonte, 2014.

MICHAEL, E.; et al. Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. **Am. J. Trop. Medicine and Hygiene**; v. 65, p. 722-778, 2001.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**; 44: 255–259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 44: 58-62, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz; Simone M. Santos, Wayner V. Souza, organizadores. Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública - Brasília : **Ministério da Saúde**, 2007.

MIRANDA, J. C.; et al. Frequency of infection of Lutzomyia Phlebotominae with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 97: 185-188, 2002.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 41, p. 365-368, 2008.

MOLAEI, G. et al. Host feeding patterns of potencial mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquilletidia*, *Psorofhora* and *Urotaenia*. **Journal Medical Entomology**; v. 6, p. 1143-1151, 2008.

MONTEIRO, E. M.; et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**; v. 38, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; v. 69, p. 393-397, 2003.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R. B. & WILSON, M. L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medicine and Entomology**; 30:427-435, 1993.

MOYA, S. L.; GIULIANI, M. G.; MANTECA, M. A.; SALOMÓN, O. D.; LIOTTA; D. J. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Trop**; 152:181-4, 2015.

MUNIZ, F.; FERNANDES, E.. Análise da expansão das áreas de cavas de mineração nos municípios de Arcos e Pains (MG) utilizando imagens Landsat. In: RASTEIRO, M.A.; MORATO, L. (orgs.) **CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA**, 32, 2013. Barreiras. Anais... Campinas: SBE, 2013. p.239-244. Disponível em: http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe_239-244.pdf. Acesso em: 21 de nov de 2018

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**; v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo; v. 56, p. 391-395, 2014.

OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE FILHO, J.D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad. Saúde Pública**; 19: 933-944, 2003.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**; 129(3-4): 219-227, 2005.

OLIVEIRA, E. F.; et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban área endemic for visceral leishmaniasis. **J. Med. Entomol.**; 50(2) 277-284, 2013.

OKSANEN, J.; et al. Vegan: community ecology package. R package version v. 1. 17. 4 [<http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>], 2010.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L.. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, 24(1):97-104, jan-mar, 2015.

PAIVA, B. R.; et al. Detection and identification of *Leishmania* species in fieldcaptured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**; v. 99, p. 252-259, 2006.

PAIVA, B. R.; et al. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 23, p. 87-94, 2007.

PAIVA, B. R. et al. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**; v. 115, p. 126-130, 2010.

PATERNINA, L. E.; et al. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. **Acta Trop**; 153:86, 2016.

PATZ, J. A.; et al. Unhealthy landscape: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environ. Health Persp.**; 112: 1092–1098, 2004.

PEREIRA, Y. N. O.; et al. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(9):2183-2186, set, 2008

PEREIRA, Agnes Antônia Sampaio. Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil. 2015. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou**. Belo Horizonte, 2015.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal Parasitology**; v. 8, p. 972-978, 2002.

PIMENTA, P. F.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: Termignoni C, Masuda H, Neto M, Silva AC, editores. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro; 2013 [citado 2015 Nov 20] Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-12ainteracao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores/view>

PITA-PEREIRA, D.; et al. Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. **Acta Trop.**; 99: 905-913, 2005.

PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev. Soc. Bras Medicina Tropical**; v. 44, p. 561-566, 2011.

PUGEDO, H. et al. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. **Rev. Soc. Bras Medicina Tropical**; v. 38, p. 70-72, 2005.

QUARESMA, P. F.; et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; 105(10): 579-585, 2011.

QUARESMA, P. F. 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, p. 480-485, 2012.

QUINNELL, R. J.; DYE, C. & SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**; 6:195-200, 1992.

RANGEL, E. F., 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**. 79: 395-396, 1984.

RANGEL, E. F.; RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 80: 373-374, 1985.

RANGEL EF, LAINSON R. Ecologia das Leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In Range EF, Lainson R editors. **Flebotomíneos do Brasil**; Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 368, 2003.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**; 24(12):2948-52, 2008.

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.

READY P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Rev Entomology**; 58: 227-250, 2013.

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, p. 1-14, 2015.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; 93: 47-49, 1999.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**; v. 124, p. 495-507, 2002.

ROSÁRIO, I; ANDRADE, A. J.; LIGEIRO, R.; ISHAK, R.; SILVA, I. M. Evaluating the Adaptation Process of Sandfly Fauna to Anthropized Environments in a Leishmaniasis Transmission Area in the Brazilian Amazon. **Journal of medical entomology**; 54(2), 450–459, 2016.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synantropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 3: 251 – 262, 2014.

RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. **Environmental Entomology**; 4: 71-77, 1975.

SAHA, S.; PATTANAYAK, S. K.; SILLS, E. O.; SINGHA, A. Under-mining health: Environmental justice and mining in India. **Health & Place**; vol. 171, p. 140-48, 2011.

SACKS, D. L.; LAWYER, P.; KAMHAWI, S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: Myler P. Fasel N, editors. *Leishmania: After the Genome*. **UK: Caister Academic Press Norfolk**; p. 205-38, 2008.

SALES, K. G. S. et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by realtime PCR. **Parasites & Vectors**; v. 8, p. 1-6, 2015.

SALOMON, O. D.; et al. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 110, p. 831-846, 2015.

SALOMON, O. D.; et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Trop.**; 113:84–7. 10, 2010.

SANGUINETTE, Cristiani de Castilho. Epidemiologia das Leishmanioses Minas Gerais, Brasil. **Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou**. Belo Horizonte, 2015.

SANT'ANNA, M. R. V. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**; v. 107, p. 230-237, 2008.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**; v. 12, p. 315-317, 1998.

SARAIVA, L.; et al. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 103: 843–846, 2008.

SARAIVA, L.; et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) and *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Minas Gerais, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 46, p. 1159-1163, 2009.

SARAIVA, L.; et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 105, p. 1033-1039, 2010.

SARAIVA, L.; et al. Survey of sand flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil. **Plos One**; v. 10, p. 1-5, 2015.

SHAW, J.; ROSA, A.T.; SOUZA, A. & CRUZ. Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**; Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 337-351, 2003.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia III- Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Rev Bras Malariol. Doenças Trop.**; 21, 541-548, 1969.

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

SHERLOCK, I. A. Importância medico veterinária. In EF Rangel and R Laison editores. **Flebotomíneos do Brasil**; Rio de Janeiro: Fiocruz, p.15-19, 2003.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**; v. 11, 2011.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, S. Utilização de técnicas de análise espacial como ferramenta para vigilância de pneumonias radiologicamente definidas na infância em Goiânia. **Ministério da educação**; 2004.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 40: 420- 425, 2007.

SILVA, L. M. R.; CUNHA, P. R.. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. **An. Bras. Dermatol.** 82(6):515-9, 2007.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomine captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp. Parasitol.**; 119: 343-348, 2008.

SILVA, A. S. G; et al. Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentar leishmaniasis. **PLoS ONE**; 12(8): e0179052, 2017.

SILVERMAN, B.W. Density estimation for statistics and data analysis. Flórida: **CRC Press**.; v. 26, 1986.

SOARES, V. Y. R.; et al. Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome b gene. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 109, p. 379-83, 2014.

SOUZA, M. B.; et al. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**; Rio de Janeiro, 19(6):1881-1885, nov-dez, 2003

SOUZA, C. M.; et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 99: 795-803, 2004.

SOUZA, A. A. A.; et al. The Phlebotominae fauna of Serra dos Carajás, Pará, Brazil, and its possible implication in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. **Rev. Pan-Amaz Saúde**; 1 (1):45- 51, 2010.

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

STUCKY, B. J. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**; v. 23, p. 90-93, 2012.

TANURE, Aline. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na localidade de Casa Branca, município de Brumadinho, área de transmissão para leishmanioses no Estado de Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2017.**

TAKKEN, W.; VILARINHOS, P.; SCHNEIDER, P.; SANTOS, F.D.. Effects of environmental change on malaria in the Amazon region of Brazil. In: Takken, W., Martens, P., Bogers, R.J. (Eds.), *Environmental Change and Malaria Risk: Global and Local Implications*. Springer, Wageningen,. 113–123, 2003.

TEODORO, U. et al., Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil Evaluation of sandfly control measures in northern Paraná State, Brazil. **Cad Saude Publica**; 23(11):2597-2604, 2007.

TEODORO U., et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**; 27:242–9, 1993.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI ELIAS, C. R.; LOROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66: 709-717, 2001.

URIBE, Sandra. The Status of the *Lutzomyia longipalpis* Species Complex and Possible Implications for *Leishmania* Transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; Rio de Janeiro, Vol. 94(6): 729-734, 1999.

VALINSKY, L.; et al. Molecular Identification of Bloodmeals From Sand Flies and Mosquitoes Collected in Israel. **Journal Medical Entomology**; v. 51, p. 678-685, 2014.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 31: 85-92, 1998.

VIRGENS, T. M.; et al. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in na American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 24, p. 2969-2978, 2008.

WARD, R. D.; RIBEIRO, A.L.; RYAN, L.; FALCÃO, A.L.; RANGEL, E. F. The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 80:145-148, 1985.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad. Saúde Publica**; 24(12):2937–40, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Global Health Observatory data**. Disponível em: www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ 2015; Acessado em 19 de novembro de 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region, 2016**. Disponível em:

https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9340/en/; Acessado em 06 de março de 2019.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, Central and South America. **Mem. Amer. Ent. Soc**; 54: 881, 1994.

ZANET, S.; SPOSIMO, P.; TRISCIUOGGIO, A.; GIANNINI, F.; STRUMIA, F.; FERROGLIO, E. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. **Vet. Parasitol.**; 199(3-4): 247-249. PMid:24295953, 2014.

ZELEDÓN, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 79: 455-459, 1984.

ANEXO

Anexo 1 – Licença permanente para coleta de material zoológico



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 Dilemardo Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU-FIDCRUZ	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 espécimes 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 pesquisas em unidade de conservação federal ou em caverna. A notificação 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 de 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 isenta o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências prévias 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 exportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO isenta 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 da licença ou autorização e os membros de 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 <i>in situ</i> .
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 da 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 falta 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/igen .
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, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMÍLIA	Psychodidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção
2	CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU-FIDCRUZ	coleção

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 1/2

