

a) Identificação do Projeto

Título: Estrutura populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual Pico do Marumbi, Piraquara, estado do Paraná, Brasil

Resumo: A subfamília Phlebotominae é representada por insetos vulgarmente conhecidos como flebotomíneos, a qual está amplamente distribuída em todo mundo com 1.006 espécies descritas das quais 277 ocorrem no Brasil, onde apenas 49 destas foram registradas no estado no Paraná. Acredita-se que essa biodiversidade esteja subestimada, dada as particularidades de cada bioma no país, aliado aos diferentes métodos de captura e o pouco conhecimento sobre a bio-ecologia da espécie, mesmo diante do papel comprovado de algumas destas na eco-epidemiologia das leishmanioses. Diante disso, neste projeto propõe-se realizar o inventário da fauna de Phlebotominae associada a: dados taxonômicos, ecológicos, biológicos e moleculares. O trabalho será realizado nos Mananciais da Serra, município de Piraquara, Paraná que é utilizada como área de ecoturismo. Todas as etapas do trabalho e autorização para coletas e transporte dos espécimes serão devidamente registradas no SISBIO e SisGen. Tendo em vista os objetivos específicos traçados, durante o ano de 2020-2021 (2 anos) irá se inventariar a fauna flebotomínica e sua flutuação sazonal, por meio de armadilhas luminosas do tipo CDC e Shannon (branca e preta), preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS), para captura de flebotomíneos em áreas de trilha e área de mata, respectivamente. Somado a isso diferentes índices ecológicos serão aplicados em função dos diferentes ecótopos e das diferentes armadilhas. Com isso, dados sobre a estrutura populacional das espécies encontradas poderão ser observados levando em conta, também, o estado fisiológico das fêmeas (sem sangue, com sangue ou grávidas), que dada a sua hematofagia, funcionam como as transmissoras de *Leishmania*. Com isso será determinada, por meio de estudo análises moleculares, se há circulação de *Leishmania* e os vertebrados utilizados como fonte alimentar (2022-2023). Conhecendo a fauna, entendendo a distribuição das espécies, de há circulação do parasito e a fontes alimentares utilizadas, associando os dados aos diferentes locais e métodos de captura, a próxima etapa visará o estudo do ritmo nictemeral das espécies que apresentarem maior densidade (2024). Durante a execução do trabalho espécies ainda não registradas para o estado ou mesmo desconhecidas pela ciência poderão ser encontradas. O projeto possui caráter interdisciplinar e interinstitucional entre diferentes áreas de estudo (taxonomia, biologia, ecologia, biodiversidade, biologia molecular) em parceria com pesquisadores de instituições públicas de ensino e pesquisa (UFPR, CPqRR/FIOCRUZ) bem como o MS, fomentando a orientação de estudantes de graduação, mestrado e doutorado.

Palavras-chave: Psychodidae, Vale do Ribeira, biodiversidade, ritmo nictemeral, fonte alimentar, *Leishmania*

b) Objetivo geral

O objetivo do projeto proposto é realizar o levantamento de fauna de Phlebotominae em Unidades de Conservação, utilizadas para ecoturismo, no Paraná.

b.1) Objetivos específicos

- A- Realizar o levantamento da fauna de flebotomíneos nos Manciais da Serra localizados no município de Piraquara visando conhecer a variação sazonal das espécies, utilizando diferentes tipos de armadilhas;
- B- Realizar capturas em áreas utilizadas como trilhas pelos visitantes e em mata fechada, para entender a estrutura populacional desses ambientes;
- C- Identificar os ecótopos das espécies por meio de análises ecológicas de diversidade, riqueza, abundância e frequência a fim de entender a relação das espécies com o ambiente;
- D- Estudar o ritmo nictemeral das espécies encontradas para entender a dinâmica de distribuição periódica das mesmas durante os anos de captura;
- E- Identificar as espécies de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos circulantes na área, por meio de análises de biologia molecular, para posterior caracterização das espécies circulantes na região;
- F- Analisar o hábito alimentar utilizado das fêmeas de flebotomíneos, coletadas nos diferentes ambientes, por meio de análises moleculares para identificação dos vertebrados utilizados como fonte sanguínea;
- G- Promover trabalhos de Educação Ambiental com a população do entorno e visitantes no que concerne aos artrópodes de importância em Saúde Pública.

c) Fundamentação Teórica

A família Psychodidae (do grego *psyche*- borboleta; *oda*- picando) está dividida em seis subfamílias: Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Horaiellinae e Psychodinae, que não possuem importância médica ou veterinária; Sycoracinae, composta por 36 espécies (incluindo três fósseis) onde há relatos de indivíduos se alimentando de animais de sangue frio; e Phlebotominae, cujas fêmeas praticam hematofagia em diversos animais, inclusive em seres humanos (YOUNG 1979). A subfamília Phlebotominae, recebeu nome a partir do gênero *Phlebotomus* (que só ocorre no Velho Mundo) (grego *phlebo*- veia; *tomus*- cortar), que devido ao hábito hematofágico das fêmeas quando ocorre a transmissão de patógenos, incluindo

espécies de *Endotrypanum*, *Bartonella*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, arbovírus, e principalmente *Leishmania*, agentes patogênicos das leishmanioses, visceral (LV) e tegumentar (LT) (MUNSTERMANN 2004).

Em todo o mundo são conhecidas 1.006 espécies de Phlebotominae, sendo que, 54% (539 espécies) já foram registradas nas Américas (Novo Mundo) e 277 (51%) delas ocorrem no Brasil (SHIMABUKURO *et al.* 2017), as quais estão incluídas em 23 gêneros, dos quais *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia* *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* apresentam importância na transmissão de leishmanias para os mamíferos (GALATI 2018). No Brasil são conhecidos, vulgarmente, como flebotomíneos ou flebótomos e esses nomes podem variar conforme a região (ex. freboti, tatuqueira, aleijadinho, asa-dura, cangalhinha) (MARTINS *et al.* 1978).

As pesquisas sobre flebotomíneos, foram e, são impulsionadas após a suspeita de algumas espécies enquanto transmissoras de patógenos, principalmente, *Leishmania* (SHERLOCK 2003). A captura desses insetos podem ser realizadas no interior de matas, peri e intradomicílios através de armadilhas que contenham uma fonte luminosa (para espécies fototrópicas) ou iscas animais (para espécies zoofílicas) e são direcionadas, na maioria das vezes, para onde ocorrem casos das doenças (MAROLI *et al.* 1997).

A biologia dos flebotomíneos varia de acordo com diversos tipos de fatores, como temperatura, umidade relativa do ar, disponibilidade de alimento e o ambiente onde desenvolve seu ciclo de vida. Alguns locais onde tem sido encontradas formas imaturas de flebotomíneos são tocas de animais no solo, fendas de rochas, troncos e buracos de árvores, cupinzeiros e guano, que são geralmente locais úmidos, ricos em matéria orgânica e protegidos da luz solar (FELICIANGELI 2004). Sabidamente o regime de chuvas ao longo da estação chuvosa, quando em níveis moderados, pode beneficiar o desenvolvimento dos flebotomíneos, mas os prejudicam quando encharca o chão, eliminando as formas imaturas naquele local (MACEDO *et al.* 2008).

As espécies de flebotomíneos podem ser divididas em três categorias, de acordo com seu habitat, as quais foram propostas na década de 40 e passados 60 anos esse cenário não é muito diferente (TEODORO *et al.* 1993, TEODORO *et al.* 2007). As espécies silvestres vivem em florestas ou bordas de mata e só acidentalmente podem ser encontradas associadas ao ser humano ou aos animais domésticos, quando estes invadem essas áreas. As chamadas espécies semidomésticas vivem fora das habitações humanas e de animais domésticos, somente procurando-as para realizar o repasto sanguíneo. São espécies exofílicas, pois

repousam de dia ou de noite fora das habitações humanas e exofágicas alimentando-se no peridomicílio. As espécies classificadas como domésticas vivem associados ao ser humano e aos animais domésticos, no interior de habitações ou próximo delas (MS 2006 a, b). São classificadas como espécies endofílicas, cujo comportamento as levam a invadir casas, e endofágicas, pois ao invadirem o interior de casas ou locais fechados, picam mais frequentemente que em locais abertos (BARRETTO 1943).

Somente as fêmeas são hematófagas cuja atividade é crepuscular e noturna, porém em área de mata esses insetos podem se alimentar durante o dia. São atraídas por uma diversidade de substâncias emitidas pelos hospedeiro veretbrado através do suor e respiração, denominadas cairomônios (*kairo-* oportunista, *hormon-* estimular). Dentre estes, o dióxido de carbono (CO₂) e o ácido láctico são atrativos para insetos hematófagos. As fêmeas quando vão se alimentar são guiadas por uma pluma de odor produzida por esses cairomônios (ANDRADE *et al.* 2008). Além dessas substâncias, a luz é outro fator que potencializa a atratividade de flebotomíneos (MAROLI *et al.* 1997). Encontram-se na literatura trabalhos demonstrando que, quando se retira a luz de um anexo peridomiciliar, menos flebotomíneos são capturados no intradomicílio, assim como ao afastar esses anexos de uma casa, praticamente a fauna torna-se inexistente no interior das casas (XIMENES *et al.* 1999). Já a capacidade de dispersão dos flebotomíneos é pouco conhecida. Há muito tempo discute-se a capacidade de vôo das espécies e não é incomum encontrar nos livros que os flebotomíneos voam em torno de 200 m por noite (FORATTINI 1973). Isso se deve, possivelmente, ao fato de serem insetos que apresentam pouca tendência em se afastar de seus abrigos e possuem vôo em saltos. Porém, em alguns estudos de recaptura, os flebotomíneos que são marcados com “pó fluorescente” têm permitido observar que algumas espécies podem ser capturadas de um a dois quilômetros do seu local de soltura (CASANOVA *et al.* 2005, GALVIS-OVALLOS *et al.* 2018). De qualquer forma, os flebotomíneos possuem movimentos silenciosos, propiciando uma aproximação de seus hospedeiros, sem serem notados, garantindo sucesso na hematofagia e manutenção do ciclo de transmissão das leishmanias (KILLICK-KENDRICK 1990). A fêmea pode fazer mais de um repasto sanguíneo sobre um mesmo hospedeiro ou, ainda, sobre hospedeiros distintos. Alguns estudos moleculares, para identificação de fontes alimentares de flebotomíneos, demonstraram que determinadas espécies têm sido encontradas com sangue de diferentes hospedeiros (ex. gambá, galinha, cão e humano) conferindo-lhes um comportmaneto oportunista (BAUM *et al.* 2015).

A região Sul é a região com menor número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a menor taxa de incidência média 2,1 casos/100.000 habitantes. Apesar disso, o estado do Paraná figura na 12^a posição em notificações por estado, totalizando n=7.878 casos de LTA, representando 92% dos casos da região Sul, e gerando uma taxa de incidência média de 4,7 casos por 100.000 habitantes (MELO & TEODORO 2018). Ainda, é aquela que apresenta menor diversidade de flebotomíneos conhecida, totalizando 54 espécies, o que corresponde a 19% da fauna do Brasil (AJA, observação pessoal). Em Santa Catarina, entre os anos de 2015 a 2018, foram notificados 22 casos autóctones de LTA. Estudos sobre a fauna de flebotomíneos e espécies vetoras do parasito, relatam a prevalência das espécies *Nyssomya neivai* e *Pintomya fischeri*, ambas encontradas em ambientes modificados e de interação antrópica, fatores que podem contribuir para o aparecimento de novos casos da doença na região (MARCONDES *et al.* 2005, GROTT *et al.* 2014, SINAN 2018). De forma semelhante no Estado do Rio Grande do Sul, foram diagnosticados em 2001 os três primeiros casos de LTA, no entanto 20 novos casos foram registrados entre os anos de 2015 a 2018 (SINAN 2018). Estudos da fauna de flebotomíneos no estado demonstraram a prevalência da espécie *Ny. neivai* e a presença das espécies *Pintomya fischeri* e *Migonemya migonei*, prováveis responsáveis pela transmissão da LTA no estado (PITA PEREIRA *et al.* 2009).

O estado do Paraná está composto, atualmente, por 49 espécies de flebotomíneos das quais três, *Brumptomyia angelae*, *B. ortizi* e *Evandromyia correalimai* foram descritas de espécimes coletados no estado (GALATI, 2018). Desde então, diversos trabalhos vêm sendo realizados com diferentes objetivos, sendo que pouco mais de 70 (18%) municípios, dos 399 possuem fauna flebotomínica conhecida, sendo que em Piraquara há estudos com flebotomíneos.

Assim, para suprir essa lacuna, propõe-se a realização do levantamento da fauna de flebotomíneos nos Mananciais da Serra visando ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência e compreender a dinâmica populacional desses insetos, para subsidiar projetos de conservação e, se necessária, implementação de políticas de controle epidemiológico. Um estudo que vise a captura de espécimes em ambientes com diferentes graus de antropização, utilizando diferentes armadilhas, associado à fonte alimentar e a possível circulação de *Leishmania* permitirá a caracterização biológica e ecológica das espécies. Somado a isso o estado fisiológico das fêmeas frente às diferentes armadilhas e a dinâmica das mesmas, com capturas diurna e noturna, permitirá observações úteis que poderão ser incorporadas pelo

Programa Nacional de Controle das Leishmanioses. No Paraná a ecologia desses insetos permanece pobremente caracterizada, principalmente em áreas de Unidades de Conservação.

d) Materiais e Metodologias a serem utilizadas.

O trabalho será realizado em parceria com o Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e a Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). Em relação aos órgãos competentes, o projeto será cadastrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

“Vouchers” dos espécimens coletados serão depositados na Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, do Departamento de Zoologia da UFPR.

d.1) Área de estudo

O estudo será realizado na região dos Mananciais da Serra, município de Piraquara, região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná (25° 30' 22"S; 45° 01' 41"W), a qual possui uma área de 2.340 hectares e está situada no extremo oeste do Primeiro Planalto Paranaense, abrangendo uma variação de altitude que vai de 890 a 1.250 metros do nível do mar (Struminski 2001). A área dos Mananciais da Serra é gerenciada pela Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) e faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) de Piraquara, inserido no Parque Estadual do Marumbi (STRUMINSKI 2001). Nos Mananciais encontram-se um dos últimos remanescentes florestais preservados na região metropolitana de Curitiba, sendo caracterizada como uma floresta em avançado estágio sucessional (REGINATO & GOLDENBERG 2007). O clima na região é subtropical úmido mesotérmico, correspondendo ao clima Cfb da escala de Köppen (MAACK 1981). Possui temperatura média no mês mais frio de 13°C e no mais quente de 21°C e precipitação acumulada anual de até 1.800 mm (CAVIGLIONE *et al.* 2000). A região dos Mananciais da Serra constitui uma área de ecótono, transição entre a Floresta Ombrófila Mista (FOM), conhecida como Floresta com Araucária e a Floresta Ombrófila Densa Montana (FODM), denominada Floresta Atlântica de encosta (REGINATO & GOLDENBERG 2007).

d.2) Levantamento e sazonalidade da fauna flebotomínica (objetivos A, B – parcial e C).

A detecção e sazonalidade das espécies de flebotomíneos identificadas serão avaliadas por meio de capturas periódicas utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, modelo HP (PUGEDO *et al.* 2005) e armadilha de Shannon (SHANNON, 1939). As capturas serão realizadas três vezes por mês com as HPs (em trilhas ou Unidades Domiciliares) como preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil e uma vez por mês com a armadilha de Shannon, em área de mata. A primeira etapa do trabalho (periodicidade das espécies), do início de 2020 ao início de 2021, e a segunda etapa (sazonalidade das espécies), do início de 2021 ao início de 2022, serão realizadas conforme descrito abaixo.

Serão instaladas 10 armadilhas HPs, sempre na altura de 1m ou 1,5m do solo (altura entre a base da armadilha e o chão) totalizando 10 pontos, equidistantes, no mínimo 400 metros. Os copos coletores das armadilhas HPs serão identificados quanto à procedência, com o nº da armadilha conforme código de cada ponto de instalação. Todos os pontos serão georreferenciados. Os dados obtidos através do georreferenciamento dos pontos de coleta, serão plotados em mapa com auxílio do *software* QGis v. 3.12, afim de ilustrar a distribuição bem como, a frequências das espécies capturadas neste estudo.

As armadilhas serão ligadas entre 17-18h e desligadas às 7-8h da manhã seguinte. O material entomológico (= copos coletores devidamente identificados) recolhido será armazenado no interior de sacos grandes e resistentes contendo mecha de algodão embebida em éter até a morte dos insetos. Ao mesmo tempo em que os copos coletores forem recolhidos, estes serão substituídos por novos copos nas armadilhas, durante os três dias consecutivos. As pilhas (ou baterias) que fornecem energia para as armadilhas serão verificadas e, se necessário, substituídas caso não estejam alimentando as armadilhas HPs corretamente.

O material entomológico coletado e devidamente armazenado será transportado até o Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde será realizada a triagem e sexagem dos flebotomíneos, os quais serão acondicionados no interior de tubos (1,5mL) contendo álcool 70% com auxílio de pinça. Todas as etapas serão realizadas sob microscópio estereoscópico. Ambos os sexos serão clarificados (FORATTINI 1973) e identificados em microscópio óptico utilizando a chave dicotômica proposta por GALATI (2018). Especificações para o procedimento com machos e fêmeas dos espécimes são descritas em detalhes nos itens d.4 e d.5.

O estado fisiológico das fêmeas será avaliado durante os 2 (anos) de estudo por meio de anotações sobre as mesmas, na ausência de sangue no sistema digestório, ingurgitadas (com sangue) e presença de ovos, para se avaliar a atratividade destas pelas armadilhas luminosas utilizadas. As pesquisas com flebotomíneos não levam em conta esses dados, mas acredita-se que os mesmos sejam importantes visto que as diferentes condições fisiológicas das fêmeas teriam implicação direta na transmissão de *Leishmania*.

Os dados climáticos serão anotados em formulário próprio, onde serão registradas as temperaturas mínimas e máximas diárias bem como a umidade relativa do ar durante o período das coletas, para se avaliar a influência de desses fatores, mais reais, na periodicidade e sazonalidade das espécies. Outras observações sobre o clima no município de Piraquara também serão obtidas junto ao SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná), para complementar as análises.

Além do conhecimento da fauna local, as capturas poderão propiciar novos registros para o estado do Paraná, bem como novas espécies a serem descritas para o Brasil, com implicações não só na distribuição geográfica das mesmas, bem como em sua biodiversidade, associados aos dados climáticos (índices ecológicos).

d.3) Ritmo nictemeral das espécies de flebotomíneos (A-parcial, B-parcial, D).

O ritmo nictemeral possibilita avaliar a atividade diária dos flebotomíneos, em diferentes ecótopos, período de maior atividade e o grau de antropofilia. Juntamente com os fatores climáticos, como temperatura e umidade relativa do ar, permitem a implementação de medidas preventivas aplicadas inclusive no cotidiano das populações que vivem em áreas de risco de contrair leishmanioses, principalmente aqueles que residem em áreas de mata, onde a aplicação de inseticidas é inviável e oferece riscos ambientais.

Serão realizadas 24 horas ininterruptas de coleta a cada 2 (dois) meses, após definida a sazonalidade das espécies (a partir do 3º ano de estudo- 2022-2023). Os flebotomíneos serão capturados com auxílio de aspiradores manuais de Oliveira Castro em barracas de Shannon nas cores branca e preta, sendo, no mínimo, 2 pessoas por barraca. Os fatores abióticos como temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%UR) serão registrados de hora em hora utilizando um termohigrômetro digital. Posteriormente, os flebotomíneos serão armazenados em potes devidamente identificados por hora de captura e levados para o Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR para identificação específica (ver item d.2).

Além dessa observação, a comparação entre as diferentes cores das armadilhas poderá oferecer dados sobre as espécies que compõem a fauna local, visto que existe diferença entre a fauna capturada por interferência das cores (GALATI *et al.* 2001). As análises dos dados seguirão o proposto por BRILHANTE *et al.* (2017). Estes espécimes não serão utilizados para qualquer tipo de análise molecular proposta.

d.4) Detecção de DNA de *Leishmania* (objetivos A- parcial, B-parcial e E).

Somente após 1 (um) ano de captura (entre 2020 e 2021) e com a periodicidade estabelecida e a fauna flebotomínica conhecida, as fêmeas serão encaminhadas para as análises moleculares a fim de analisar a presença de DNA de *Leishmania spp.* Para montagem e identificação das fêmeas o mesmo procedimento acima descrito acima (item f.2) será realizado, porém a cabeça e a porção final do abdômen (quatro últimos segmentos) serão dissecados. O restante do corpo (tórax, asas, pernas e abdômen) será acondicionado em álcool 70%, colocado a -20°C para posterior análise molecular. Os abdômens das fêmeas serão agrupados em pools (de 2 a 10 espécimes) de acordo com a espécie, local de captura, unidade domiciliar (UD) e data da coleta. Cada pool será transferido para um tubo estéril de 1,5 ml para a extração de DNA, usando o Kit Illustra Tissue and Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), de acordo com as normas recomendadas pelo fabricante.

Para a detecção de isolados de *Leishmania* será realizada PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) empregando os iniciadores B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') (BRUJIN & BARKER 1992). Esses iniciadores são específicos para o subgênero *Viannia*. As reações de todas PCRs serão realizadas no termociclador Sequenciador Automático de DNA modelo ABI 3130 (Applied Biosystems®) e os produtos serão submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,6%, corados com brometo de etídeo. Na sequência, todas as bandas serão visualizadas por meio de um transluminador de UV e, em seguida, fotografadas. Como controle positivo, amostras de cultivo de *L. braziliensis* mantidas no Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR serão utilizadas.

Para realização da reação de sequenciamento o produto de PCR será purificado com ExoSap-IT (USB®) conforme recomendação do fabricante. A reação de sequenciamento será submetida à precipitação por acetato de amônio e posteriormente ao sequenciador automático Applied Biosystems® 3500 (PAIVA 2007). As sequências de ambas as fitas serão editadas no programa BioEdit (HALL 1999) e no MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

(TAMURA *et al.* 2011), que produzirá uma fita consenso para cada amostra. As sequências serão comparadas com sequências disponíveis no GenBank para avaliação da identidade, através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool - BLAST®.

Fêmeas ingurgitadas não serão utilizadas para a detecção de *Leishmania*, pois esta serão utilizadas para indentificação do sangue do hospedeiro conforme descrito no item d.5. 19

d.5) Caracterização da fonte alimentar (objetivos A- parcial, B-parcial e F).

Para identificação dos hospedeiros, o abdômen das fêmeas ingurgitadas (com sangue) será removido e acondicionado em álcool 70%. A identificação das espécies se dará conforme descrito no item d.2 e somente após o primeiro ano de estudo (ver item d.4).

As fêmeas serão colocadas individualmente em tubos de 1,5 ml para trituração utilizando pistilo (autoclável) em 10 µl de solução de extração (grinding mix). Após a trituração serão adicionados mais 240µl de grinding mix e 25µl de solução de SDS, incubando-se por 15 minutos a 65°C em banho seco. Em seguida as amostras serão colocadas em gelo por 5 minutos, para posterior centrifugação. Serão adicionados 160 µl de acetato de potássio e agitado por aproximadamente 10 segundos, centrifugado e levado ao gelo por 30 minutos. Os tubos serão ainda centrifugados por 2 minutos a 13000-rpm e o sobrenadante transferido para novo tubo com 600 µl de Isopropanol absoluto e homogeneizado por inversão. Uma terceira centrifugação será realizada por 2 minutos a 13000-rpm e descartado o sobrenadante. Na sequência serão adicionados então 600 µl de etanol 70% e feita nova centrifugação nos mesmos parâmetros das anteriores. O sobrenadante será novamente descartado e os tubos serão colocados em estufa a 37°C para secagem. O DNA será ressuspendido em 20 µl de solução TE. Em seguida os tubos serão estocados a -20°C para posterior utilização na PCR. A qualidade da extração de DNA genômico dos flebotomíneos será avaliada por PCR utilizando NanoDrop® e os oligonucleotídeos CB3-PDR (5' – CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAAT GATA – 3') e N1N-PDR (5' – GGTA(C/T)(A/T)TTGCCGCGA(T/A)TTCG(T/A) TATGA – 3') que amplificam um fragmento de 544 bp (pares de bases) do DNA mitocondrial de flebotomíneos (DIAS JUNIOR 2008).

O protocolo de extração do DNA (*HotSHOT*) será realizado segundo Truett et al. (2000), Alcaide et al. (2009) e Martínez-de la Puente et al. (2013), para extração de DNA do sangue presente em abdômen de insetos hematófagos. Após a dissolução do sangue, a solução será incubada em termociclador a 95 C durante 30 minutos, e, após, colocada em gelo por

quatro a cinco minutos. Em seguida, serão adicionados 50 µL de solução de neutralização (Tris-HCl 40 mM, pH 5,0), homogeneizando cuidadosamente as amostras. Após a quantificação do DNA no NanoDrop[®], as amostras serão armazenadas a -20 °C até a amplificação por PCR.

Os *primers* utilizados serão os desenvolvidos por ALCAIDE *et al.* (2009) com base na sequência do gene mitocondrial COI de vertebrados das classes Amphibia, Reptilia, Aves e Mammalia. O *primer* universal (M13BC-FW 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT HAA YCA YAA RGA YAT YGG NAC-3') foi projetado com o seu reverso (BCV-RV1 5'-GCY CAN AYY ATN CYR RTR W-3') para impedir a co-amplificação de DNA de invertebrados, permitindo a identificação específica somente de vertebrados (ALCAIDE *et al.* 2009).

Os protocolos de PCR também serão baseados em ALCAIDE *et al.* (2009). As condições de amplificação serão: desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, seguida de 39 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 45 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 7 minutos a 72 °C, em termociclador (Bio-Rad). No processo de purificação será utilizando o *QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)* conforme as orientações do fabricante. Após a purificação, as amostras serão enviadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA da Universidade de São Paulo (USP). As reações para sequenciamento serão realizadas com *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* e o sequenciamento em equipamento *ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems)*.

Para identificação da fonte alimentar, as sequências *forward* e *reverse* serão alinhadas com MUSCLE do programa MEGA 6 e seus consensos serão gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5, que também será utilizado para fazer as edições manuais com base nos cromatogramas das mesmas. A identificação será realizada por comparação através da ferramenta BLAST, usando bancos de dados de sequências de DNA como o *Barcoding of Life Data Systems (BOLD: http://www.barcodinglife.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)* e o *National Center for Biotechnology Information (Genbank: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)*. As sequências serão atribuídas a uma espécie em particular somente quando apresentarem similaridade \geq 98%.

d.6) Análise estatística (objetivos A, B, C, D).

Para comparação entre as armadilhas, entre as áreas de captura e entre as espécies capturadas serão utilizados, após verificação na normalidade dos dados, os testes não-paramétricos de Mann-Whitney ou Test-t e/ou de Kruskal-Wallis ou ANOVA, em que os dados serão significativos levando em conta o valor de $p < 0,05$, utilizando o pacote estatístico BioEstat v. 5.3 (AYRES *et al.* 2007). De acordo com as observações realizadas ao longo da execução do projeto, essas análises poderão ser alteradas a fim de se obter um maior refinamento dos dados.

Além do conhecimento da fauna local, sobreposição das espécies vetoras e casos de LTA, as coletas fornecerão, no futuro, dados de indicadores de biodiversidade e frequência mensal dos flebotômíneos, associados aos dados climáticos que poderão ser calculados utilizando o programa PAST v. 2.0 (HAMMER *et al.* 2001).

e) Equipe

EQUIPE EXECUTORA	INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS	PARTICIPAÇÃO	TITULAÇÃO
Andrey José de Andrade	Universidade Federal do Paraná (UFPR)	Coordenador	Doutorado
Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro	Universidade Federal do Paraná (UFPR)	Colaboradora	Doutorado
Paloma Helena Fernandes Shimabukuro	Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/BH)	Colaboradora	Doutorado
Rafaella Albuquerque da Silva	Programa Nacional de Controle das Leishmanioses, Ministério da Saúde (MS)	Colaboradora	Doutorado
Letícia Cristina Morelli	Universidade Federal do Paraná (UFPR)	Colaboradora	Mestranda
Salvador Paganella Júnior	Universidade Federal do Paraná (UFPR)	Colaborador	Mestrando
Maurício dos Santos Conceição	Universidade Federal do Paraná (UFPR)	Colaborador	Mestrando

f) Cronograma de atividades proposto.

Atividades	2020		2021		2022		2023		2024	
	1º Semestre	2º Semestre								
Pesquisa Bibliográfica e elaboração de um banco de dados										
Aquisição do material e planejamento das atividades										
Ajustes das metodologias e visita das áreas										
Levantamento de fauna de flebotomíneo (Periodicidade)										
Levantamento de fauna de flebotomíneo (Sazonalidade)										
Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. e caracterização das espécies circulantes										
Determinação de fonte alimentar (análise molecular)										
Realização das análises ecológicas										
Análises dos resultados										
Divulgação no meio científico (congressos e revistas científicas)										
Elaboração dos relatórios anuais										

g) Infraestrutura disponível

O Laboratório de Parasitologia Molecular (Departamento de Patologia Básica) dispõe de uma técnica de nível superior e tem espaço de 200 m² com os seguintes equipamentos: câmaras de fluxo laminar (02), capela de exaustão (01), fontes para eletroforese (03), cubas para eletroforese de diferentes tamanhos (05), balanças analíticas (03), espectrofotômetros (02), microscópios ópticos (05), microscópios estereoscópicos (03), microscópio óptico com equipamento fotográfico (01), termociclador (01), aparelho de fotodocumentação (01), freezers (03), freezer -80°C (01), geladeiras (06), centrífugas refrigeradas (02), microcentrífugas para tubos do tipo eppendorf (02), agitadores magnéticos (03), vortex (03), máquina de gelo (01), medidor de pH (01), microscópio para imunofluorescência (01), agitadores magnéticos (02), autoclave (01), galão de nitrogênio líquido (01), destilador e deionizador (01), armadilha de Shannon (1). O espaço ainda possui 1 (um) laboratório multidisciplinar de Nível de Segurança 2 (NB2).

As armadilhas luminosas do tipo HP (20) e Shannon (01), bem como os capturadores manuais (4) serão fornecidas pelo Programa de Controle de Leishmanioses do Ministério da Saúde.

h) Produtos e impactos esperados.

O envolvimento de estudantes de graduação (iniciação científica), mestrado e doutorado será planejado ao longo do desenvolvimento do projeto, caso aprovado no presente edital, formando-se assim recursos humanos nas diferentes áreas de estudo. O coordenador da proposta encontra-se vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP) da UFPR, assim dissertações e teses ligadas à pesquisa serão os resultados iniciais da mesma.

Artigos científicos serão produzidos visando sempre publicações em revistas nacionais e internacionais indexadas de acesso aberto. Somado a isso, a possibilidade de divulgação de resultados prévios em eventos científicos, congressos, simpósios, workshops na área.

Previsão de cronograma, conforme objetivos traçados:

Relatório 1 (2020-2021): conhecimento da fauna com capturas em peridomicílio (CDC) e área de mata (Shannon) e consequente avaliação da periodicidade das espécies. (a- fauna flebotomínica; b- comparação das armadilhas; c- separação dos espécimes fêmeas conforme a observação do trato digestório).

Relatório 2 (2021-2022): continuidade das capturas para avaliar a sazonalidade das espécies; separação dos espécimes para as análises moleculares (presença de DNA de *Leishmania* e detecção de fonte alimentar). (a- determinar áreas e épocas mais vulneráveis a possível presença de *Leishmania*; b- definir o comportamento das espécies em área antropizada e florestada; c- caracterizar a espécie de *Leishmania* circulante; d- indicar os possíveis insetos vetores; e- determinar quais vertebrados são utilizados como fonte alimentar para essas espécies).

Relatório 3 (2020-2023): com a identificação dos ecótopos, aliados aos dados abióticos, proceder com as análises ecológicas e determinar o ritmo nictemeral das espécies, focado, principalmente naquelas que possam funcionar como transmissoras de *Leishmania* na área de estudo. (a- relacionar as áreas de captura, diante dos dados previamente coletados; b- entender a dinâmica de flutuação das espécies no período de 24 horas, após definidos os meses com maior frequência e diversidade das mesmas).

Relatório 4 (2023-2024): fornecer ao IAP e a SANEPAR, por meio da confecção de um documento técnico, dados científicos. Atrelados a esses relatórios haverá as autorizações que se façam necessárias, bem como certificados de resumos (pôsteres e/ou apresentações orais), palestras, participações em eventos científicos e artigos publicados.

- Firmar parcerias pré-estabelecidas, como aquelas do CPqRR e do MS, novos pesquisadores e linhas de pesquisa serão agregados ao estudo promovendo intercâmbio entre os estudantes e alavancando os estudos com flebotomíneos no estado no Paraná.

- Identificar as espécies suspeitas na transmissão de *Leishmania*, a distribuição das mesmas nos municípios, a época mais propícia para se adquirir a doença e quais os fatores risco ambientais favorecem essas relações, o que tem implicações diretas para órgãos públicos dos municípios.

- Determinar o estado fisiológico das fêmeas das espécies (intestino vazio, com sangue ou ovos) frente às armadilhas e ecótopos de captura, o que agregará novas informações sobre a biologia e ecologia dos flebotomíneos.

- Além do conhecimento faunístico, poderá haver novos registros de espécies para o estado no Paraná, com implicações para sua distribuição geográfica no Brasil e também a descrição de novas espécies desconhecidas para a ciência, com impacto positivo para a biodiversidade.

- Depósito dos espécimes de *vouchers* dos espécimens coletados na Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, do Departamento de Zoologia da UFPR.
- Regularização da pesquisa no SISBIO e no SisGen.
- Aquisição de novos insumos para pesquisa a serem patrimoniados na UFPR e alocados no Laboratório de Parasitologia Molecular dessa instituição.
- Orientação de dissertações de mestrado e teses de doutorado nas diferentes áreas de conhecimento às quais se relaciona o projeto.
- Participação, por parte do coordenador e estudantes, em congressos nacionais e internacionais para divulgação dos resultados, bem como produção de artigos científicos para publicação em revistas indexadas de acesso aberto.
- Elaboração de um manual técnico a ser oferecido aos órgãos competentes com os dados mais relevantes da pesquisa na região.

Sou colaborador no projeto de pesquisa liderado pela Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (CPqRR/BH) denominado “Integrando formas e moléculas: uma proposta para o estudo dos flebotomíneos neotropicais (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), Edital Universal 2015 FAPEMIG (APQ- 02569-15)” no qual parte dos flebotomíneos coletados no presente estudo poderão ser empregados nas análises. Ainda em colaboração com a Dra. Paloma, um dos responsáveis pelo grupo no Catálogo Taxonômico de Fauna do Brasil. Para o desenvolvimento deste projeto foram firmadas, ainda, colaborações com o Ministério da Saúde (MS).

O coordenador tem experiência em Entomologia Médica e, em particular com a subfamília Phlebotominae, e a equipe executora apresenta ampla experiência de campo com o grupo, parte em nível acadêmico e parte em serviço de saúde. Quanto ao laboratório, os integrantes irão colaborar com todas as análises moleculares propostas no presente estudo.

A colaboração entre diferentes áreas (taxonomia, ecologia, biodiversidade, biologia molecular) e pesquisadores (as) de instituições públicas de ensino (UFPR, CPqRR e MS), de pesquisa (CPqRR), bem como o Ministério da Saúde (MS), proporciona a este projeto um caráter interdisciplinar e interinstitucional. Toda a equipe terá relação direta (coleta em campo, preparação dos espécimes, detecção de DNA de *Leishmania* e mamíferos) e/ou indireta (análises ecológicas, leitura e interpretação dos dados moleculares, escrita dos artigos) com a proposta deste estudo. Maiores informações sobre a equipe executora podem ser observadas no item b.

i) Referências bibliográficas

Alcaide M.; Rico C.; Ruiz S. et al. (2009) Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. PLoS ONE. 4.: e7092.

Andrade AJ.; Andrade MR.; Dias ES. et al. (2008). Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 103: 337-343

Anjos A. (2018). Avaliação macrorregional e microrregional da Leishmaniose Tegumentar Americana Humana e canina no Estado do Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 142 pp.

Ayres M. et al. (2007) BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 364p.

Barretto MP. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Livre-Docência, 1943, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 162p.

Baum M.; de Castro EA.; Pinto MC. et al (2015) Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. Acta Tropica. 143:8- 12.

Brilhante AF.; de Ávila MM.; de Souza JF et al. (2017). Attractiveness of black and white modified Shannon traps to phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in the Brazilian Amazon Basin, an area of intense transmission of American cutaneous leishmaniasis. Parasite. 24: 20.

Brujin M.; Barker DC. (1992) Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica. 52: 45-58.

Casanova C.; Costa AIP.; Natal D. (2005). Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 719-724.

Dias Junior MGS. (2008). Caracterização de espécies de *Leishmania* isoladas de flebotomíneos sp. De três ecótopos da Serra dos Carajás, Pará, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 72 pp.

Feliciangeli MD (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology. 18: 71-80.

Forattini OP. (1973). Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Editora Edgar Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo. 658 pp.

Galati EAB. (2018) Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) – Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil, 127 pp.

Galati EAB; Nunes VLB; Dorval MEC et al. (2001). Attractiveness of black Shannon trap for phlebotomines. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 96: 641–647.

Galvis-Ovallos F.; Casanova C.; Bergamschi DP. et al. (2018). A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Disease. 12: e0006333.

Hall TA. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium. 4: 95-98.

Hammer O.; Harper DAT; Ryan PD. (2001). PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. http://palaeoelectronic.org/2001_1/past/issue1_01.htm [Acessado em: 09/09/2018]

IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidades>. Site consultado em 10 de março de 2016.

Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4: 1-24.

Macedo ITF.; Bevilaqua CML.; Morais NB. et al. (2008). Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal.* 18: 67-74.

Maroli M.; Feliciangeli MD.; Arias J (1997). Métodos de captura, Conservacion y Montaje de los Flebotomos (Diptera: Psychodidae). OPS/OMS/HCP/HCT/95/97, Washington. 72 p.

Martins AV.; Williams P.; Falcão AL. (1978) American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 195 pp.

Melo HA & Teodoro DFRU. Effect of vegetation on cutaneous leishmaniasis in Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo*, v. 113: p.1 70505, 2018.

Ministério da Saúde Leishmaniose visceral (calazar) (2006a) - 1980–2005 Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf. Acesso em: 10/09/2018.

Ministério da Saúde Leishmaniose tegumentar Americana (2006b)- 1980–2005 Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniose_2006.pdf. Acesso em: 10/09/2018.

Munstermann LE (2004). Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC, Black WC, Freier J, Hagedorn H, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B (Ed.) *Biology of Disease Vectors*, 2nd Edition, Elsevier Science, San Diego, p. 141-151.

Paiva BR.; Secundino NSC.; Pimenta PFP et al. (2007) Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cadernos de Saúde Pública.* 23: p.87-94.

Pugedo H.; Barata RA.; França-Silva JC. et al. (2005). HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 38: 70-72.

Shannon R. (1939) Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 19: 131-140.

Sherlock I. (2003) A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R (Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003, p. 15-21.

Shimabukuro PHF.; Andrade AJ.; Galati EAB (2017) Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* 660: 67-106

Tamura K.; Peterson D.; Peterson N. et al., (2011). MEGA 5. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.* 28: 2731-2739.

Teodoro U.; La Salvia Filho V.; Lima EM et al. (1993) 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. *Revista de Saúde Pública.* 27: 242-249.

Teodoro U.; Lonardon MYC.; Silveira TGY et al. (2007) Light and heat as attraction factors of *Nyssomyia whitmani* in a rural area, Southern Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* 41: 383-388.

Truett GE.; Heeger P.; Mynatt RL et al. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques.* 29: 52–54.

Projeto de Pesquisa apresentado ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) para realização de Pesquisas Científicas em Unidades de Conservação.

Ximenes MFFM.; Souza MF.; Castellón EG. (1999). Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94: 427-432.

Young D. (1979) A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Institute of Food and Agricultural Sciences; Agricultural Experiment Stations, Gainesville. Technical Bulletin 806, 266 p.