

## 1- Título português:

Determinação de cavidades naturais subterrâneas como áreas de risco para leishmaniose tegumentar e visceral

## 2. Resumo

Para que uma cavidade natural subterrânea (caverna), e seu entorno, possam ser caracterizados como áreas de risco potencial para infecção por *Leishmania*, associado a ocorrência de casos de leishmanioses, relações ecológicas e biológicas devem ser esclarecidas. Sabe-se que as “doenças transmitidas por artrópodes” (*arthropod borne-disease*) são suscetíveis a fatores bióticos e abióticos. Embora, de forma geral, ocorra uma maior estabilidade ambiental em Unidades de Conservação (UCs) e, sobretudo, nos ecossistemas nelas inseridas (incluindo as cavernas), o mesmo não acontece nas áreas contíguas a estas, devido a desmatamento, acúmulo de lixo e uso indevido do solo. Essas ações antrópicas impactam na ecoepidemiologia das leishmanioses ampliando a distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos e dos vertebrados, reservatórios de *Leishmania*, e expondo a população que frequentam cavernas ou que esteja próxima a essas áreas ao risco de infecção. No Brasil, 145 (52%) espécies de flebotomíneos já foram registradas em cavernas e 17 (6%) novas espécies foram descritas a partir desses ecossistemas. Daquele total, 21 (8%) são conhecidas como potenciais vetoras de espécies de *Leishmania* e 13 (60%) apresentam algum tipo de relação direta com cavernas. O ecossistema cavernícola é propício à manutenção do ciclo de vida de flebotomíneos, pois fornece abrigo e alimento, atuando como área de risco de infecção por *Leishmania*. Embora haja dados empíricos acerca do desenvolvimento de leishmanioses, em humanos, após a entrada nesses ambientes, até o momento, no Brasil, não há pesquisas que os suportem. A ausência de pesquisa científica nesse escopo se dá possivelmente pela subnotificação dos casos decorrente do fato de que cavernas não são classificadas como local provável de infecção (LPI) Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde. Neste contexto, este projeto visa compreender o papel desempenhado pelas UCs na epidemiologia das leishmanioses e avaliar os ecossistemas cavernícolas como áreas de risco para a ocorrência dessas doenças, a fim de propor cavernas como áreas de risco, contribuindo, também, com os planos de manejo destas áreas protegidas onde estas cavernas estão inseridas. O estudo será dividido em duas partes: (i) mapeamento das cavernas localizadas em UCs Federais que podem atuar como áreas de risco para infecção de leishmanioses e; (ii) inventário da fauna de flebotomíneos em UCs Estaduais utilizadas em atividades turísticas (Gruta da Lancinha e na Gruta dos Jesuítas), e seus entornos, para determinar o possível papel de cavernas na manutenção de ciclos de espécies de *Leishmania*. Dessa forma o presente estudo faz-se necessário pois além de subsidiar ações de manejo das UCs Estaduais atendendo a Instrução Normativa MMA nº 2/2017 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), servirá como ferramenta de gestão aos órgãos públicos das esferas federais, estaduais e municipais de saúde, conforme diretrizes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas CECAV para manejo espeleológico. A ausência de pesquisa científica nesse escopo se dá possivelmente pela subnotificação dos casos decorrente do fato de que cavernas não são tidas como local provável de infecção (LPI) no sistema de notificação e agravos do Ministério da Saúde Brasileiro. Neste contexto, este projeto visa compreender o papel desempenhado pelas UCs leishmanioses e avaliar os ecossistemas cavernícolas como áreas de risco para a ocorrência de leishmanioses, a fim de propor cavernas como LPI para leishmanioses, contribuindo, também, com os planos de manejo destas áreas protegidas onde

estas cavernas estão inseridas. O estudo será dividido em duas partes: (i) mapeamento das cavernas localizadas em UCs Federais que podem atuar como áreas de risco para infecção de leishmanioses e; (ii) inventário da fauna de flebotomíneos em UCs Estaduais utilizadas em atividades turísticas (Gruta da Lancinha e na Gruta dos Jesuítas), e seus entornos, para determinar o possível papel de cavernas na manutenção de ciclos de espécies de *Leishmania*. Dessa forma o presente estudo faz-se necessário pois além de subsidiar ações de manejo das UCs Estaduais atendendo instrução normativa do MMA, servirá como ferramenta de gestão aos órgãos públicos das esferas federais, estaduais e municipais de saúde, conforme diretrizes do CECAV para manejo espeleológico.

**Palavras-chave:** Flebotomíneos, *Leishmania*, cavernas, conservação, saúde pública.

### 3. Contextualização e Justificativa

A presença de Unidades de Conservação (UCs) permite a proteção integral de diferentes ecossistemas, incluindo cavernas, atenuando assim os impactos causados por ações antrópicas e promovendo um planejamento adequado para uso contínuo (ROCHA et al. 2004). De acordo com a Instrução Normativa MMA nº 2/2017 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), levantamentos de fauna cavernícola são importantes para determinação do grau de relevância das cavidades naturais subterrâneas (cavernas), pois considera, além de outros atributos, a riqueza de espécies, o grau de endemismo, a presença de espécies raras, e o nível de ameaça das mesmas. Assim para proposição de medidas de conservação e manejo de cavernas faz-se necessário o conhecimento mais amplo de toda comunidade faunística associada (SHARRAT et al. 2000, SOUZA-SILVA et al. 2011).

De acordo com as diretrizes e orientações técnicas para a elaboração de Planos de Manejo Espeleológicos do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV, 2022) o item 5.2 trata sobre a importância do estudo de “Organismos Patógenos e Nocivos”. Dentre estes, destacam-se os flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) pois algumas espécies, registradas em cavernas, atuam como vetoras de protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses (CAMPOS et al. 2020). As leishmanioses, na sua forma tegumentar e visceral, são Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) que colocam sob risco de infecção 350 milhões de pessoas, gerando mais de dois milhões de novos casos anualmente (OMS 2018), sendo que em torno de 70.000 são registrado nas Américas e desses, aproximadamente 30.000 (43%) ocorrem no Brasil (ALVAR et al. 2012). Segundo Andrade et al. (2002) e Dutra-Rêgo et al. (2022) a ocorrência desses insetos em ambientes cavernícolas, é relatada de forma pontual, não considerando

aspectos ecológicos e/ou comportamentais das espécies registradas. Além disso, são raras as pesquisas, a longo prazo, que realizaram algum tipo de monitoramento da ocorrência de flebotomíneos nestes ambientes (ANDRADE *et al.* 2002), bem como da fonte sanguínea utilizada pelas fêmeas das espécies (COSTA *et al.* 2021). Estudos de monitoramento de fauna cavernícola são de extrema relevância, tendo em vista que várias espécies já registradas em cavernas podem atuar como vetoras de patógenos de importantes zoonoses com impacto na saúde única (SANTOS *et al.* 2017, CAMPOS *et al.* 2020), onde os flebotomíneos é um dos mais importantes grupos de vetores estudados (ANDRADE *et al.* 2020). Atualmente, a subfamília possui 1.051 espécies distribuídas mundialmente (SHIMABUKURO *et al.* 2017, CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022) sendo que, das 277 espécies que ocorrem no Brasil, 145 (52%) já foram registradas em cavernas e, daquele total, 21 (8%) são conhecidas como potenciais vetoras de espécies de *Leishmania* onde 13 (60%) apresentam alguma relação direta com cavernas. Cabe destacar que, cavernas estão entre os ecossistemas menos explorados do mundo e, portanto, é um ambiente que favorece o registro e a descrição de espécies ainda desconhecidas para a ciência, como *Sciopemyia shimabukuroae* (CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022) e *Lutzomyia itambe* (CHAVES JÚNIOR *et al.* 2023) por exemplo, gerando dados sobre a biodiversidade do grupo, e por consequência, em relação a importância de preservação destes ambientes.

Apesar da maior estabilidade ambiental esperada nas áreas protegidas e em seus diversos ecossistemas, incluindo as cavernas, o mesmo, muitas vezes, não ocorre nas áreas contíguas as UCs, devido, principalmente, ao desmatamento e consequente alteração do uso e ocupação do solo. Salienta-se que, as “doenças transmitidas por artópodes” (*artropod borne-disease*) são particularmente suscetíveis a alterações ambientais e climáticas, uma vez que sua ocorrência depende do balanço ecológico entre diferentes espécies envolvidas nos ciclos de transmissão (RANGEL *et al.* 2023). Sabe-se que a ecoepidemiologia das leishmanioses está intimamente ligada à diversidade e abundância de espécies de flebotomíneos, cuja dinâmica populacional é afetada por fatores abióticos, como pluviosidade, umidade e temperatura. Essas variáveis influenciam na sua dinâmica populacional, bem como o metabolismo e interações com parasitos do gênero *Leishmania* (OSHAGHI *et al.* 2009, SALOMÓN *et al.* 2012). Especialistas relatam que um dos impactos das crescentes mudanças ambientais e climáticas na ecoepidemiologia das leishmanioses seja a ampliação da distribuição geográfica dos vetores e reservatórios (MENDES *et al.* 2016). No Brasil, flebotomíneos vêm sendo capturados em cavernas de diferentes litotipos rochosos. Todas as cinco regiões

geográficas do Brasil possuem cavernas amostradas com registro desses insetos (ANDRADE *et al.* 2022). Entretanto, a maioria desses estudos tendem apenas a inventariar a fauna flebotomínica (GALATI *et al.* 2003, BARATA *et al.* 2008, CARVALHO *et al.* 2013, MONTEIRO *et al.* 2016), ocorrendo um menor número de observações que visam a detecção de espécies de *Leishmania* circulantes (OGAWA *et al.* 2016, CARVALHO *et al.* 2017, ALMEIDA *et al.* 2019) e, menos ainda, sobre as fontes alimentares utilizadas (COSTA *et al.* 2021). Assim, afim de mitigar lacunas na ecoepidemiologia de diversas doenças relacionadas à insetos vetores, análises moleculares vem sendo empregadas para a melhor compreensão destes ciclos (TELANG *et al.* 2018, OMONDI; DEMIR, 2021).

Nesse sentido, para flebotomíneos, estudos de sua bionomia e dos habitats ocupados pelas espécies, aliados à presença (ou não) de parasitos e dos recursos alimentares têm gerado informações relevantes para os programas de vigilância e controle de vetores (PAIVA *et al.* 2007; PITA-PEREIRA *et al.* 2009). Mesmo diante dessas informações, não existe qualquer registro sobre o papel dos ecossistemas cavernícolas como áreas de risco para aquisição de leishmanioses no Brasil. Isso se deve a possíveis subnotificações de casos, visto que, embora as leishmanioses sejam de notificação obrigatória, na ficha do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, cavernas não constam como local provável de infecção (LPI). Relatos informais de casos de leishmaniose tegumentar entre praticantes de espeleologia (pesquisadores, esportistas ou mesmo turistas) já foram registrados (ANDRADE *et al.* 2022). Em 2021, Siller Junior e colaboradores divulgaram o caso de um turista da Califórnia que adquiriu a forma cutânea da doença (leishmaniose tegumentar) após visitar uma caverna no México, tratando-se da única notificação publicada para as Américas.

Nas cavernas, as larvas de flebotomíneos podem utilizar, como fonte de alimento, tanto a matéria orgânica carregado para o interior deste ambientes pela ação da água ou por gravidade, o guano de morcegos e de aves, bem como as excretas de outros vertebrados ou carcaças de vertebrados e invertebrados. Na fase adulta, somente as fêmeas são hematófagas e as cavernas abrigam variadas fontes alimentares, como morcegos, roedores, aves, lagartos, anfíbios além de outros vertebrados. Assim, nesses ambientes, as espécies de flebotomínios podem manter uma relação com esses animais, quer seja utilizando fezes (guano) como criadouros (ALVES *et al.* 2011, BARATA; APOLINÁRIO, 2012) ou realizando a comprovada hematofagia

nesses animais (COSTA *et al.* 2021). Ainda, de forma geral, cavernas são ambientes bastante heterogêneos em relação a sua morfologia e presença de microhabitats, podendo oferecer recursos variados que podem servir como criadouros ou refúgio para as formas aladas.

Visando determinar o papel que as UCs e os ecossistemas cavernícolas desempenham na infecção e manutenção dos ciclo das leishmanioses esse estudo irá gerar, de forma inédita, modelos de mapas de áreas de potencial risco para infecção elaborado para UCs Federais previamente amostradas, associada a dados publicados e espécies depositadas em coleções científicas, suspeitas e/ou comprovadas, como vetoras de *Leishmania* (READY 2013). Ainda serão consideradas as notificações de leishmanioses em municípios do entorno onde ocorreram casos nos últimos cinco anos. Dessa forma será prestado um modelo protocolar de serviço preventivo e de utilidade aos órgãos ambientais ligados às atividades de gestão, espeleoturismo e de licenciamento espeleológico.

Sabendo que na região Sul do Brasil não há pesquisas com flebotomíneos em cavernas, nesse projeto propõe-se, a partir do levantamento da fauna flebotomínica em duas UCs Estaduais, Gruta da Lancinha localizada em um Monumento Natural (MONA) e na Gruta dos Jesuítas, localizada no Parque Estadual de Campinhos (PEC), e nos seus entornos, trazer novas perspectivas sobre o conhecimento desses insetos associados às cavernas do Paraná. O estudo irá possibilitar a realização de novos registros para o grupo nestes ambientes ou mesmo a descoberta de novas espécies de flebotomíneos, além de contribuir para conhecimento e conservação do patrimônio espeleológico estadual. O projeto atenderá aos componentes 1 e 2 do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (Portaria MMA n° 358 de 30/09/2009) cujos objetivos preveem apoiar a produção de inventários através da realização e pesquisas e a conservação *in situ* dos ecossistemas visando a conservação do patrimônio espeleológico, respectivamente. Somado a isso, as análises moleculares para detecção de DNA de *Leishmania* em fêmeas das espécies de flebotomíneos encontradas nas duas UCs, sinalizarão, preventivamente, áreas de potencial risco para infecção humana por leishmanioses, principalmente por se tratarem de cavernas abertas a visitação turística. Dessa forma, o projeto também atenderá, as diretrizes para elaboração de Planos de Manejo Espeleológicos conforme determina o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV, 2022). Já a identificação de potenciais hospedeiros reservatórios será fornecida pela fonte

alimentar utilizada por essas fêmeas e permitirá o acesso a dados ecoepidemiológicos importantes e, em sua maioria, desconhecidos pela comunidade científica. Dessa forma, será possível fornecer dados que servirão de modelo para órgãos ambientais ligados às atividades de gestão pública ambiental e sanitária, ao espeleoturismo e ao licenciamento ambiental espeleológico. Assim, espera-se inventariar os flebotomíneos em cavernas abertas à visitação, no estado do Paraná, a fim de detectar novos registros e/ou descrever novas espécies nesses ecótopos, trazendo destaque a potenciais áreas de risco para infecção humana por espécies de *Leishmania*.

#### 4. Objetivo

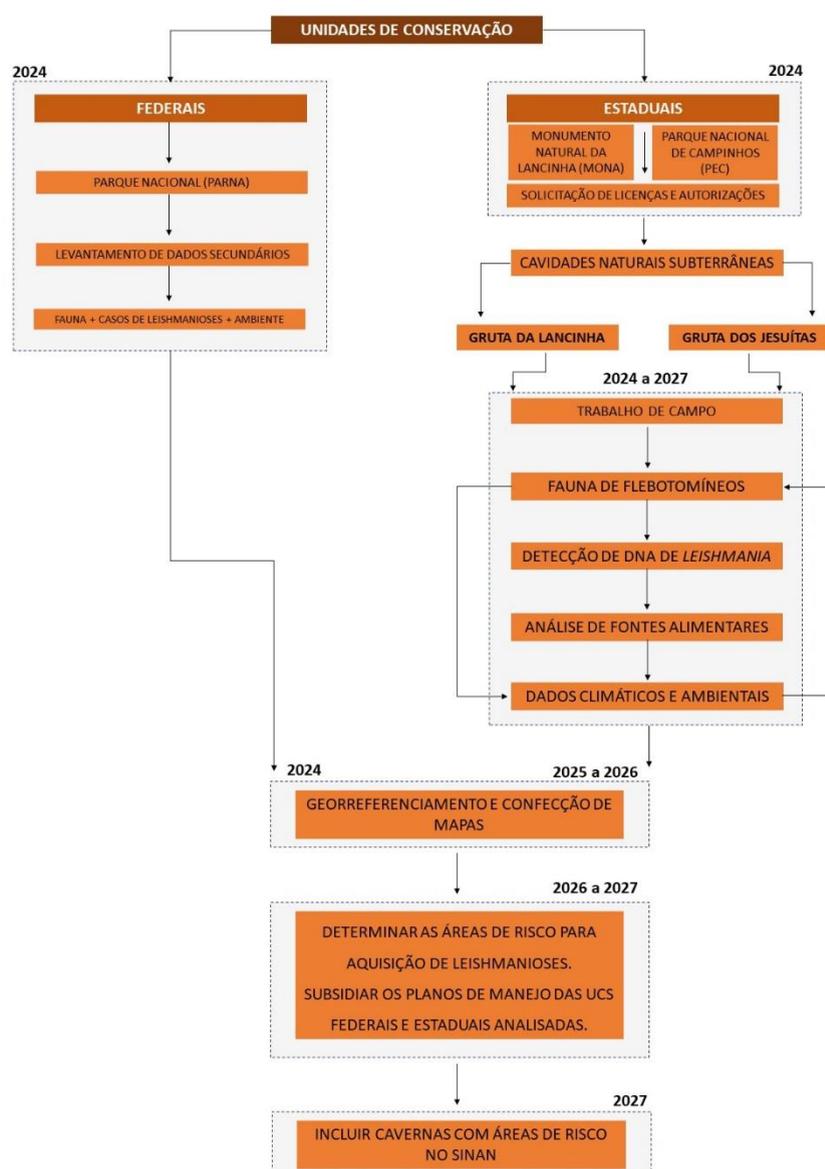
Compreender o papel que as cavernas desempenham como áreas de risco para a ocorrência de leishmanioses comprovando que estes ambientes são locais prováveis de infecção contribuindo com os planos de manejo das Unidades de Conservação onde estas estão inseridas e fortalecendo ações de saúde pública

#### 5. Objetivos específicos

- Produzir, para cada UC Federal e Estadual, analisada, mapas de potencialidade de risco para leishmanioses, servindo como modelo piloto a ser aplicado, posteriormente, a nível nacional;
- Gerar informações sobre biodiversidade por meio de novos registros de flebotomíneos ou descrição de novas espécies que possam subsidiar a conservação do patrimônio espeleológico;
- Identificar, a nível molecular, as espécies de *Leishmania* circulantes na Gruta da Lancinha e na Gruta dos Jesuítas e nas áreas dos entornos, determinando o possível papel do ambiente cavernícola na manutenção dos ciclos ecoepidemiológicos das leishmanioses;
- Conhecer localmente os vertebrados utilizados como fonte sanguínea pelas fêmeas de flebotomíneos;
- Determinar os possíveis ciclos de transmissão de *Leishmania* e áreas de risco para aquisição de leishmanioses;
- Aprimorar, a partir das informações taxonômicas e biológicas a serem obtidas ao longo do estudo, os planos de manejo das UCs analisadas;
- Propor, junto ao Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde do Brasil, cavernas como locais prováveis de infecção prevendo ações de monitoramento e controle.

## 6. Metodologia

O fluxograma apresentado (Figura 1) ilustra as etapas do trabalhos previstas para Unidades de Conservação Federais e Estaduais.



**Figura 1:** Fluxograma de atividades do projeto previsto para realização de 2024 a 2027.

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

### **6.1.1. Unidades de Conservação (UCs) a serem utilizadas para análise de dados secundários**

Para escolha das UCs Federais, levando em conta os dados secundários publicados, serão respeitados, de forma associada, os seguintes pré-requisitos: 1) serão analisados inventários de espécies de flebotomíneos realizados em cavernas de três UCs inserida na categoria de Parque Nacional (PARNA), sendo que cada UC deverá pertencer a uma região diferente do Brasil; 2) serão selecionadas UCs federais onde ocorreu (ram) registro(s) de espécie(s) vetora(s) de leishmaniose tegumentar e/ou visceral; 3) UCs com números representativos de visita/ano; 4) Estudo de Plano de manejo espeleológico elaborado e/ou implantando; 5) Presença de desmatamento ou uso recente de ocupação/modificação do solo no entorno da UC.

### **6.1.2. Parque Estadual de Campinhos (PEC)**

O Parque Estadual de Campinhos (49°05'W e 25°02'S) foi criado em 1960, pelo Decreto Estadual nº 31.013 e ampliado pelo Decreto Estadual nº 5.768, com o objetivo principal de proteção das Grutas do Conjunto Jesuítas. Com uma área de 336,98 hectares, o PEC abrange parte dos Municípios de Tunas do Paraná e Cerro Azul. O principal atrativo do PEC é a Gruta dos Jesuítas, a 5ª maior do estado do Paraná, com uma extensão de 550 metros (<https://www.iat.pr.gov.br/Arquivo/Plano-de-Manejo-PE-Campinhos>). A região do PEC apresenta um relevo montanhoso, com altitude média em torno de 900 metros, constituída por rochas do Grupo Açungui. Esta região apresenta alta concentração de cavernas e feições de relevo calcário. Na região do PEC ocorria, originalmente, a Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária), entretanto, em função da extensão antrópica, pouco resta da cobertura original (<https://www.iat.pr.gov.br/Arquivo/Plano-de-Manejo-PE-Campinhos>).

### **6.1.3 Monumento Natural da Gruta da Lancinha**

A Gruta da Lancinha (25° 10' 6" S; 49° 17' 14" O) é uma das mais conhecidas cavernas do Paraná, sendo visitada há no mínimo 150 anos. Situa-se no município de Rio Branco do Sul, inserido na Região Metropolitana de Curitiba e distante cerca de 50 km da capital Curitiba.

Apresenta terrenos de maior declividade e com presença de afloramento de rocha calcária, tendo utilização

limitada no passado, o que manteve a vegetação mais conservada. Por outro lado, esta vegetação está sujeita ao efeito de borda e tem sua evolução comprometida, principalmente nos limites com as estradas rurais que cruzam sobre a gruta. Além da vegetação, pode ser observado no entorno da gruta de Lancinha atividades de silvicultura, pastagem/agricultura e mineração, das quais as duas primeiras são também observadas no interior da UC. Próximo as moradias, existem áreas utilizadas para pasto e agricultura rudimentar, assim como áreas abandonadas apresentando vegetação em estágio inicial de regeneração, denominada capoeirinha (Grupo de Estudos Espeleológicos-Açungui, comunicação pessoal). Dessa forma, atualmente, a Unidade de Conservação Estadual é do tipo Monumento Natural (MONA), conforme decreto estadual nº 6.538/2006 e Patrimônio tombado pela Coordenação do Patrimônio Cultural (CPC-PR). A cavidade natural subterrânea é formada principalmente pela dissolução e precipitação do carbonato. A região onde está localizada a gruta está inserida na Região Fitoecológica da Floresta Ombrófila Mista, conhecida como floresta com araucária, conforme IBGE (2012).

Ressalta-se que a cavidade possui máxima relevância, já que abriga espécies troglóbias ameaçadas de extinção, sendo local de ocorrência do pseudoescorpião *Ideoroncus cavicola* (EN) e do colêmbolo *Arrhopalites paranaenses* (CR), esse último endêmico e restrito à Gruta da Lancinha (ICMBio, 2018).

## **6.2. Levantamentos das notificações de casos de leishmanioses nas UCs e região e das espécies potenciais vetoradas de *Leishmania* spp. inventariadas nas cavernas das demais áreas**

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

Para análise dos dados de literatura, referente a cada UC Federal, será realizado um corte temporal para sobreposição com os casos de leishmanioses humana, a partir da última publicação sobre a fauna flebotomínica em caverna da região. Para tal, serão utilizados artigos científicos publicados e indexados; dissertações e teses; consultas à coleções biológicas; bem como sites como DATASUS e Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde; Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE) e; Secretarias Municipais de Saúde. O período mínimo será de cinco anos e o máximo irá depender da data de publicação do artigo norteador. Um mapa também será elaborado para o MONA da Gruta da Lancinha e para o PEC da Gruta dos Jesuítas.

### 6.3. Elaboração dos Mapas de potencialidade de risco para leishmanioses

Para a elaboração dos mapas de potencialidades de risco para transmissão de leishmanioses, serão elaborados mapa de calor utilizando o índice de Densidade Kernel, nas UCs e entorno. Estes mapas serão elaborados através do software QGis V. 3.22.3-Białowieża, RRID:SCR\_018507. Será estabelecido um raio de busca que poderá variar de 5 a 50 km de cada caverna amostrada, para uma série temporal de no mínimo cinco anos, a partir do último registro e trabalho envolvendo flebotomíneos vetores nas localidades sobrepondo essas ocorrências com as notificações de casos de leishmanioses em humanos. Para escolha das UCs Federais, levando em conta os dados secundários publicados, serão respeitados, de forma associada, os seguintes pré-requisitos: 1) serão analisados inventários de espécies de flebotomíneos realizados em cavernas de três UCs inserida na categoria de Parque Nacional (PARNA), sendo que cada UC deverá pertencer a uma região diferente do Brasil; 2) serão selecionadas UCs federais onde ocorreram registros de espécies vetoras de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar e/ou visceral; 3) UCs com números representativos de visitação/ano; 4) Estudo de Plano de manejo espeleológico elaborado e/ou implantando. Para auxiliar na seleção das UCs Federais e cavernas que integrarão o estudo será utilizado o capítulo publicado por Andrade *et al.* (2022) e o artigo de Dutra-Rêgo *et al.* (2022), que compilam informações sobre flebotomíneos registrados em cavernas no Brasil. Para análise dos dados de literatura, referente a cada UC Federal, será realizado um corte temporal para sobreposição com os casos de leishmanioses humana, a partir da última publicação sobre a fauna flebotomínica em caverna da região. Para tal, serão utilizados artigos científicos publicados e indexados; dissertações e teses; consultas   coleções biológicas; bem como sites como DATASUS e Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde; Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE) e; Secretarias Municipais de Saúde. O período mínimo será de cinco anos e o máximo irá depender da data de publicação do artigo norteador.

### 6.4. Coleta e acondicionamento de flebotomíneos nas Unidades de Conserva o Estaduais

Serão utilizadas 13 armadilhas luminosas do tipo CDC (interior e entorno), uma Shannon (entorno), duas armadilhas de Malaise (entorno) e busca ativa (interior), entre janeiro de 2024 a fevereiro 2027 (36 meses). No interior das cavernas as CDCs serão instaladas por meio de trip s, sem que haja contato com as paredes e as coletas manuais serão realizadas posicionando microtubos sob os espécimes de flebotomíneos pousados nas superfícies (COSTA *et al.* 2021). Para cada caverna, as CDCs serão instaladas, a princípio uma vez por mês entre

18:00 e 08:00, respeitando o horário de atividade dos flebotomíneos e a 1,5 metro do solo, conforme preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses (MS, 2006). Serão instaladas duas armadilhas em zona afótica, duas em zona disfótica e duas na entrada das cavernas (zona fótica). As demais serão instaladas, conforme descrito acima, em áreas do entorno, seguindo as trilhas a uma distância aproximada de 200 metros entre elas.

A armadilha de Shannon, por se tratar de uma armadilha passiva, será instalada entre 18:00 e 21:00 horas em área de mata e a captura dos flebotomíneos será feita por meio de aspiradores bucais durante uma noite. A armadilha de Malaise, por ser uma método de interceptação de vôo de insetos, permanecerá instalada durante um mês em cada área (ANDRADE *et al.* 2022).

As coletas contam com a autorização expedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - número 90248-1), o Instituto de Águas e Terras (IAT) e Coordenação do Patrimônio Cultural (CPC-PR). Para execução do mesmo e divulgação dos resultados esse será cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Como as armadilhas de Malaise e CDC são generalistas, ou sejam, capturam diversos grupos de artrópodes, alguns procedimentos serão adotados para futuras colaborações. Após triagem dos flebotomíneos, o material coletado será depositado na Coleção de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica (DPAT) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (ColPar/DPAT/UFPR) (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/co446>) e na Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure (DZUP) (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/co0>). .

As etapas de campo contarão com o auxílio de acadêmicos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (PGENTO) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP), ambos da Universidade Federal do Paraná, e do Grupo de Estudos Espeleológicos-Açungui (GEEP-Açungui).

## 6.5. Etapas de laboratório

### 6.5.1. Identificação e depósito dos espécimes

Para identificação específica, todos os machos coletados serão clarificados e montados entre lâmina e lamínula, conforme Forattini (1973). Os mesmos serão utilizados para os possíveis novos registros, bem como indicar a ocorrência de novas espécies de flebotomíneos (CHAVES JÚNIOR *et al.* 2022, 2023). A identificação específica

seguirá a proposta de Galati (2018). Havendo a possibilidade de descrição de espécies desconhecidas para a ciência todo material-tipo será depositado Coleção de Flebotomíneos (Fiocruz/COLFLEB) (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/co39>).

#### **6.5.2. Dissecção do abdômen das fêmeas e preparo para extração de DNA**

Após quatro meses de coletas, para conhecimento da fauna de flebotomíneos das duas UCs Estaduais, se dará início à dissecção das fêmeas para as análises moleculares. Para detecção das espécies de *Leishmania* e das fontes alimentares, os flebotomíneos serão acondicionados em álcool 70% e mantidos em freezer -20° C (SALES *et al.* 2020). As fêmeas terão os três últimos segmentos do abdômen e a cabeça retirados, clarificados e montados para identificação a nível específico. As fêmeas serão individualizadas por espécie, codificadas e receberão anotações sobre a presença ou não de sangue no intestino. Aquelas com sangue total ou parcialmente digerido serão direcionadas para as análises de fonte alimentar, e aquelas que não apresentarem resquícios de sangue no intestino, para a detecção de DNA de *Leishmania*.

As fêmeas destinadas para a detecção de DNA de *Leishmania* ou de fontes alimentares, serão as provenientes das armadilhas CDC, Shannon e de capturas manuais, pois o tempo de exposição detas na Malaise em campo (sem refrigeração), possivelmente não permitirá essas análises devido à degradação do material.

#### **6.5.3. Detecção de presença de DNA de *Leishmania* spp.**

A extração de DNA será realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA®, Madison, WI, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Após a extração do DNA, para investigar a infecção natural por *Leishmania* spp., as amostras serão submetidas à PCR Multiplex. Para a amplificação da região constante no minicírculo do kDNA do gênero *Leishmania* seguirá Passos *et al.* (1996). Para o controle endógeno da extração será utilizado o par de oligonucleotídeos conforme Lins *et al.* (2002) direcionado ao gene constitutivo “cacophony” que é específico para flebotomíneos, de acordo com PITA-PEREIRA *et al.* (2009). O sequenciamento de DNA, após a purificação, será realizado no Centro de Pesquisas de Célula-Tronco da Universidade de São Paulo. Outros métodos e marcadores moleculares como ITS1 poderão ser utilizados no decorrer no projeto.

#### **6.5.4. Detecção das fontes alimentares**

O protocolo a ser utilizado será denominado HotSHOT, testado por Truett *et al.* (2000) e aplicado por Alcaide *et al.* (2009), Martínez-de la Puente *et al.* (2013) e Costa *et al.* (2021) na extração de DNA do sangue. Serão utilizados oligonucleotídeos desenvolvidos por Alcaide *et al.* (2009) referentes ao gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase I) de vertebrados das classes Amphibia, Reptilia, Aves e Mammalia. O protocolo de nested PCR seguirá Alcaide *et al.* (2009) e modificado por Santos *et al.* (2019). Cada reação irá incluir um controle negativo e um controle positivo estabelecido e utilizado por Santos *et al.* (2019). Os produtos da PCR serão verificados por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras amplificadas com sucesso serão purificadas usando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen®) e sequenciadas no Centro de Pesquisas de Célula-Tronco da Universidade de São Paulo.

#### 6.6. Dados climáticos e demais variáveis da etapa de campo

Variáveis abióticas como pluviosidade (mm), umidade relativa (%) e temperatura (°C) das áreas de estudo serão obtidas, mensalmente, junto ao SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná) utilizando a estação mais próxima localizadas nos municípios onde estão inseridas as cavernas. Além destes, no interior das cavernas serão obtidos dados de temperatura e umidade aferidos utilizando-se termohigrômetros digitais para compreensão do padrão de distribuição das espécies capturadas. Os seguintes dados serão testados em relação a estas variáveis: i) abundância (quantidade de espécimes e/ou espécies por mês); ii) sazonalidade (distribuição dos espécimes e/ou espécies em relação aos fatores abióticos); iii) sexo (macho ou fêmea); iv) pontos de coleta (zona afótica, disfótica, entrada e área do entorno); v) fêmeas com presença de DNA de *Leishmania*; e vi) fontes alimentares utilizadas. Índices ecológicos de diversidade, riqueza e equidade entre as áreas estudo serão calculados utilizando o software PAST - Palaeontological Statistics, versão 1.81 (HAMMER *et al.* 2008). Diante dos dados coletados, ainda será possível comparar as duas cavernas (Lancinha e Jesuítas) frente a essas variáveis.

#### 6.7. Cálculos e análises estatísticas

A taxa de infecção natural de flebotomíneos será dada a partir do cálculo do número de *pools* ou número de fêmeas dissecadas positivos/ número total de fêmeas x 100 (VASCONCELOS *et al.* 2019). O índice de constância de espécies será calculado a partir da fórmula:  $C = P \cdot 100 / N$  (SILVEIRA NETO *et al.* 1976).

Após verificar a normalidade dos dados e para critério de decisão serão aplicados o Teste t de Student (distribuição normal) ou Mann-Whitney (distribuição não-normal). Acima de duas, após análise da Normalidade,

será utilizado o ANOVA ou Kruskal-Wallis para amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para avaliar a interferência dos fatores abióticos na distribuição da fauna e cada uma das espécies mais abundantes, também após análise da Normalidade dos dados, será utilizado o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Para todas as análises, os dados serão considerados significativos levando em conta o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o BIOESTAT Versão 5.0. As análises estatísticas inicialmente propostas poderão ser revisadas após o processamento dos dados coletados em campo.

## 7. Resultados a serem alcançados

O projeto atenderá aos componentes 1 e 2 do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico (Portaria MMA nº 358, de 30 de novembro de 2009) e aos Planos de Manejo Espeleológicos (CECAV, 2022). A busca e sobreposição dos dados ligados às leishmanioses, para as UCs Federais, indicarão quais Parques Nacionais no Brasil seriam áreas de risco para aquisição das doenças como impacto nos determinantes de saúde única frente a exposição aos patógenos para a população local e para aqueles que frequentam cavernas. Será possível os primeiros registros de flebotomíneos em cavernas no Paraná, assim como o conhecimento dos vertebrados, que servem de fonte alimentar (potenciais reservatórios de *Leishmania* spp.). Dessa forma, será avaliado o papel destas cavernas na manutenção do ciclo das leishmanioses, considerando o endemismo da região onde estas estão inseridas (MELO *et al.* 2018). Além do conhecimento dessa biodiversidade flebotomínica, possivelmente haverá a descrição de novas espécies. A presença espécies vetoras e a suas relações com os potenciais reservatórios poderão auxiliar na definição das cavernas ou áreas do entorno como de risco subsidiando os planos de manejo das UCs. Assim poderão ser orientados futuros trabalhos de educação e conscientização ambiental relacionados a saúde única, a partir de parcerias com secretarias municipais e estaduais de saúde com o apoio dos órgãos ambientais locais, incluindo o ICMBio.

## 8. Produtos

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

- (i) Artigos em revistas científicas indexadas nacionais e internacionais; informes sobre os resultados em revistas de sociedades ou de comunicações científicas (ex. EspeleInfo, Sociedade Brasileira de Espeleologia, etc.);

- (ii) Resumos e apresentações orais em eventos nacionais e internacionais das diferentes áreas do projeto (Espeleologia, espeleoturismo, parasitologia, entomologia, etologia, medicina, biologia da conservação e saúde pública);
- (iii) Formação de recursos humanos no que tange à pesquisas de graduação (iniciação científica) e pós graduação (mestrandos e doutorandos);
- (iv) Matérias e entrevistas para mídia não científica sobre a importância de conservação do patrimônio espeleológico, das áreas protegidas e entorno, com foco na Saúde Única.
- (v) Prestação de serviço de utilidade aos órgãos federais, estaduais e municipais de saúde e meio ambiente ligados às atividades de gestão, espeleoturismo e de licenciamento espeleológicos.
- (vi) Realização de palestras e confecção de material educativo para gestores, guias da Ucs e comunidades do entorno sobre saúde única.

### 9. Cronograma de execução

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (BIMESTRAL)					
	2023					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Elaboração e submissão da proposta. Assinatura do acordo pela UFPR.						
Licenças e regularizações para execução do projeto						
Aquisição dos insumos e planejamento das atividades						
Coletas prévias dos flebotomíneos nas áreas de estudo para conhecimento da fauna						
Processamento e identificação dos espécimes						

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (BIMESTRAL)					
	2024					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Aquisição dos insumos						

Coleta dos flebotomíneos nas áreas de estudo						
Processamento e identificação dos espécimes						
Relatório Parcial 1 e renovação da licença						
Análises moleculares para identificação de infecção por <i>Leishmania</i> .						
Análises moleculares para identificação de fontes alimentares						

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (BIMESTRAL)					
	2025					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Análise da periodicidade de flebotomíneos nas áreas de estudo						
Relatório Parcial 2 e renovação da licença						
Coleta dos flebotomíneos nas áreas de estudo						
Processamento e identificação dos espécimes						
Análises moleculares para identificação de infecção por <i>Leishmania</i> .						
Análises moleculares para identificação de fontes alimentares						

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (BIMESTRAL)					
	2026					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Análise da sazonalidade de flebotomíneos nas áreas de estudo						
Coleta dos flebotomíneos nas áreas de estudo						
Processamento e identificação dos espécimes						
Relatório Parcial 3 e renovação da licença						
Análises moleculares para identificação de infecção por <i>Leishmania</i> .						
Análises moleculares para identificação de fontes alimentares						

1. ATIVIDADES	2. CRONOGRAMA (BIMESTRAL)					
	2027					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Relatório Parcial 4 e renovação da licença						
Coleta dos flebotomíneos nas áreas de estudo						
Processamento e identificação dos espécimes						
Análises moleculares para identificação de infecção por <i>Leishmania</i> .						
Análises moleculares para identificação de fontes alimentares						
Elaboração e entrega do Relatório Técnico Final						

## 10. Equipe

3. Nome	Função	Instituição	Formação Acadêmica	Lattes
ANDREY JOSÉ DE ANDRADE	COORDENADOR	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	DOUTORADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/1336198809290025">http://lattes.cnpq.br/1336198809290025</a>
KLEBER MAKOTO MISE	PESQUISADOR	GRUPO DE ESTUDOS ESPELEOLÓGICOS DO PARANÁ - AÇUNGUI, GEEP-AÇUNGUI	DOUTORADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/1175591326990286">http://lattes.cnpq.br/1175591326990286</a>
JULIO CESAR ROCHA COSTA	PESQUISADORS	INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE	DOUTORADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/9434303070714614">http://lattes.cnpq.br/9434303070714614</a>
ROBSON DE ALMEIRA ZAMPAULO	COLABORADOR	OBSERVATÓRIO ESPELOLÓGICO	MESTRADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/0159146240464433">http://lattes.cnpq.br/0159146240464433</a>
SALVADOR PAGANELLA CHAVES JÚNIOR	COLABORADOR	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	MESTRADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/1793231124758816">http://lattes.cnpq.br/1793231124758816</a>
LUCAS ROSSITO DE CARVALHO	COLABORADOR	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	GRADUAÇÃO (BIÓLOGO)	<a href="http://lattes.cnpq.br/8813334722983306">http://lattes.cnpq.br/8813334722983306</a>

GABRIEL DE SOUZA GHEDIN	COLABORADOR	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	MESTRADO	<a href="http://lattes.cnpq.br/9949805659123543">http://lattes.cnpq.br/9949805659123543</a>
MARIANA FUNCHAL GUSSO	COLABORADORA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	GRADUANDA DE BIOLOGIA	<a href="http://lattes.cnpq.br/0537313954589835">http://lattes.cnpq.br/0537313954589835</a>
CLARA BENETTI DE LEMOS CORDEIRO	COLABORADORA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	GRADUANDA DE BIOLOGIA	<a href="http://lattes.cnpq.br/3326529450218286">http://lattes.cnpq.br/3326529450218286</a>

## 11. Referências

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

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

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

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

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

ANDRADE A.J; CHAVES-JÚNIOR S.P.C; MORELLI L.C; SANTOS-CONCEIÇÃO M; SHIMABUKURO PHF. Taxonomia e Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus Impactos na Saúde Pública., p. 137-153.

In: OLIVEIRA, J. et al. Atualidades em medicina topical no Brasil: Vetores, Strictu Sensu, Rio Branco, p. 263, 2020.

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

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

BRASIL. Decreto s/n, de 05 de junho de 2017. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, localizado nos Municípios de Canaã de Carajás e Parauapebas, Estado do Pará. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/dsn/Dsn14470.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/dsn/Dsn14470.htm). Acesso em: 05 jan. 2022.

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

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

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

Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV, 2022). **Planos de Manejo Espeleológico: diretrizes e orientações técnicas.** Disponível em: [https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/orientacoes-e-procedimentos/plano-de-manejo-espeleologico-1/pme-diretrizes-cecav-ed\\_2022.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecav/orientacoes-e-procedimentos/plano-de-manejo-espeleologico-1/pme-diretrizes-cecav-ed_2022.pdf). Acessado em: 21/06/2023.

CHAVES JUNIOR S.P; LIMA G.C; MENDONÇA, R.P; ANDRADE A.J. Description of a new species of the genus *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera: Phlebotominae) and of the male of *Lutzomyia fonsecai* (Costa Lima, 1932). *Zootaxa*. 5277(3): 521-537, 2023.

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

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

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

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

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

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

GALATI E.A.B; NUNES V.L; BOGGIANI P.C; DORVAL M.E.C; CRISTALDO G; ROCHA H.C; ISHIRO E.T; GONÇALVES DE ANDRADE R.M; NAUFEL G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato

Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 47(2): 283-296, 2003.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST - Paleontological Statistics, ver. 1.81 (<http://folk.uio.no/chammer/past>). 2008. » <http://folk.uio.no/chammer/past>

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

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII – Invertebrados -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018.

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

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

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

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

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

Disponível

em

<

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf)> Acesso em fev. 2022.

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

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

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

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

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

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

RANGEL E.F; CARVALHO B.M; COSTA S.M; SHAW J.J. . Sand fly vectors of American Cutaneous Leishmaniasis. In:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

/