

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANDREY JOSÉ DE ANDRADE**

**RELATÓRIO FINAL APRESENTADO AO INSTITUTO ÁGUA E TERRA  
(IAT/PARANÁ)**

**ESTRUTURA POPULACIONAL DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:  
PHLEBOTOMINAE) NOS MANANCIAIS DA SERRA, PIRAQUARA, ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL**

**CURITIBA**

**2024**

## RESUMO

Em todo o mundo são conhecidas 1.060 espécies de Phlebotominae, sendo que 54% (556 espécies) já foram registradas nas Américas e 290 (51%) delas ocorrem no Brasil. A região Sul do Brasil detém a menor diversidade de flebotomíneos, totalizando 54 espécies, o que corresponde a 19% da fauna brasileira, sendo 49 destas registradas no estado do Paraná. Embora diversa, quando comparada aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, pouco se conhece sobre essa fauna e sua relação com ambientes preservados. Os flebotomíneos são os vetores de protozoários do gênero *Leishmania* spp., agentes etiológicos das leishmanioses. Estudos recentes têm investigado a importância da detecção de outros tripanossomatídeos em amostras clínicas de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar e visceral, como aqueles do gênero *Crithidia* spp. Até o momento existem poucos registros de flagelados monoxenos em flebotomíneos brasileiros comparados com os de *Leishmania*. Assim o presente estudo visou inventariar a fauna de Phlebotominae em uma área do Parque Estadual do Marumbi, utilizada para ecoturismo, no Paraná. Os trabalhos de campo foram realizados, durante dois dias mensais, entre setembro/2022 e agosto/2023, utilizando 3 armadilhas: luminosa CDC, de Shannon e de Malaise, instaladas nas bordas mata e interior da mata. Os insetos capturados foram levados para laboratório para serem triados, sexados e identificados em nível específico. Parte das fêmeas foram analisadas por meio de biologia molecular, para detecção de tripanossomatídeos. Foram capturados 592 espécimes de flebotomíneos, sendo 562 (95%) fêmeas e 30 (5%) machos, representados por 9 espécies: *Brumptomyia troglodytes*, *Br. ortizi*, *Evandromyia edwardsi*, *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia lanei*, *Pintomyia monticola*, *Br. bragai*, *Pa. ribeirensis* e *Migonemyia vaniaae*. As três últimas foram registrados pela primeira vez no estado aumentando sua diversidade para 52 espécies e ressaltando a importância da área de estudo na diversidade do grupo. *Pintomyia monticola* foi a mais abundante, sendo considerada uma espécie antropofílica o que pode expor os visitantes do parque a picada pelas fêmeas. A armadilha CDC permitiu a captura de uma maior diversidade de espécies, porém a Shannon apresentou a maior abundância, ressaltando a importância do uso de diferentes métodos de captura para inventários de fauna de flebotomíneos. Foram analisados 18 pools com 1 a 10 espécimes de flebotomíneos cada, todos pertencentes à espécie *Pi. monticola*. O DNA extraído foi amplificado por método de PCR convencional usando os primers TRY927/SSU561 para tripanossomatídeos e HSP70 para o gênero *Leishmania*. As amostras positivas foram sequenciadas por método de Sanger e usadas para a construção da árvore filogenética. Não foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* sp., mas um dos pools amplificou para *Crithidia* sp., e a filogenia evidenciou que era uma espécie de *Crithidia* desconhecida pela ciência e o primeiro registro de *Crithidia* sp. em *Pi. monticola*. Esses achados demonstram o potencial da área para estudo de diversidade de flebotomíneos no Paraná, a qual, levando em conta os resultados apresentados não seria considerada área de risco para as leishmanioses.

**PALAVRAS-CHAVE:** Psychodidae, Diversidade, Entomologia Médica, *Crithidia*.

## INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (**Figura 1**) são dípteros da família Psychodidae e da subfamília Phlebotominae. Apresentam o corpo coberto do por cerdas, com asas que quando em repouso ficam em posição semiereta. São insetos holometábolos, isto é, possuem a fase de ovo, larva, pupa e sua forma adulta que se desenvolvem em solo úmido, sombreado e rico em matéria orgânica. Os machos se alimentam de seiva de plantas e as fêmeas são hematófagas e o sangue é essencial para que ocorra a oviposição e seu ciclo vital seja concluído. Seu comportamento pode variar dependendo da espécie, mas em sua maioria possuem atividade vespertina/noturna, entretanto já foram relatadas atividades em outros períodos do dia (FORATTINI, 1973; BRAZIL, BRAZIL, 2003).



**Figura 1:** Espécimes fêmeas de flebotomíneos (3 a 5 mm) coletados nos Mananciais da Serra, município de Piraquara, estado do Paraná, Brasil. (Foto: Clara Benetti).

Fêmeas adultas (**Figura 1**) são hematófagas e, algumas espécies, transmitem protozoários do gênero *Leishmania*, causadores das leishmanioses classicamente conhecidas como leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar (AKHOUNDI et al., 2016). As leishmanioses são zoonoses consideradas negligenciadas e devido à inexistência de vacinas, a única medida preventiva é, a partir do conhecimento da fauna, o controle dos flebotomíneos (BRAY et al., 2014; COURTENAY et al., 2017; AGUIAR, VIEIRA, 2018). A amostragem dos espécimes é feita pela busca dos adultos através do uso de armadilhas que tem como atrativo isca de fonte luminosa e/ou animal (BRAZIL et al., 2015; BENNAI et al., 2018).

A presença do ser humano em áreas florestadas, como aquelas de ecoturismo, pode expor a infecção pelas espécies de *Leishmania* e uma das formas de classificar possíveis áreas de risco é conhecer a periodicidade e/ou sazonalidade das possíveis espécies vetoras, suspeitas ou comprovadas, em diferentes habitats (SILVA et al., 2018; LEONEL, 2019). Porém, a diversidade da fauna flebotomínica irá variar conforme diversos fatores, como temperatura, umidade relativa do ar, disponibilidade de alimento e o local onde desenvolve seu ciclo de vida (FELICIANGELI, 2004). Assim, as espécies de flebotomíneos são categorizadas de acordo com seus habitats (TEODORO et al., 1993, 2007): (i) silvestres, que vivem no interior de florestas ou em bordas de mata; (ii) semidomésticas, vivem fora das habitações humanas e de animais domésticos, somente procurando-as para realizar o repasto sanguíneo; (iii) domésticas, vivem associadas ao ser humano e aos animais domésticos, no interior de habitações ou próximo delas (MS 2006 a, b).

Segundo essas categorias, a área proposta para o presente estudo pode ser classificada como silvestre e que por ser uma área de ecoturismo, proporcionaria um contato mais próximo com a natureza e a biodiversidade nela existente, bem como, com potenciais agentes causadores de enfermidades. Nos parques utilizados para ecoturismo, o ciclo de vida dos agentes causadores das leishmanioses, encontram-se estabelecidos, e na presença de algumas espécies de flebotomíneos podem oferecer risco para os visitantes (UZCÁTEGUI et al., 2020). Dessa forma, caracterizar a fauna dessa área, avaliando sua composição e estrutura populacional, fornecerá dados importantes sobre a bioecologia das espécies e a detecção de possíveis vetores suspeitos ou comprovados.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Flebotomíneos são insetos da ordem Diptera pertencentes à família Psychodidae, conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, anjinho e outros (FORATTINI, 1973). Os insetos adultos apresentam porte pequeno, tendo por volta de 2 a 4 mm de comprimento, apresentando como característica o corpo coberto por cerdas e asas que, quando em repouso, ficam em posição semiereta. A capacidade de dispersão dos flebotomíneos é pouco conhecida. Há muito tempo discute-se a capacidade de voo 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 voo em saltos (BRAZIL, BRAZIL, 2003). A fêmea pode fazer mais de um repasto sanguíneo sobre um mesmo hospedeiro ou, ainda, sobre hospedeiros distintos. Alguns estudos moleculares, demonstraram que determinadas espécies têm sido encontradas com sangue de diferentes hospedeiros (ex. gambá, galinha, cão e humano) conferindo-lhes um comportamento oportunista (BAUM et al. 2015).

Como todo díptero, são insetos holometábolos, com estágios de ovo, larva e pupa antes de se tornarem adultos. Possuem hábito crepuscular e sua atividade diminui com o passar das horas, porém em área de mata esses insetos podem se alimentar durante o dia (FORATTINI 1973). Durante o dia, em sua maioria, procuram abrigos e lá permanecem em repouso. 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 têm 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).

Pelo caráter hematofágico das fêmeas, elas são importantes vetores de parasitos de importância médica e veterinária sendo eles três tipos de protozoários

tripanossomatídeos: *Endotrypanum* e *Trypanosoma* e *Leishmania* (BRAZIL, BRAZIL, 2014). Entre os parasitos do gênero *Leishmania* estão as espécies que causam a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), doenças que acometem humanos e outros animais (SHERLOCK, 2003, LAINSON e RANGEL, 2005; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017). A LV consiste em uma doença infecciosa crônica que se manifesta por meio de anemia, febre irregular e aumento do baço, podendo ser fatal para o ser humano (DE SOUZA et al. 2012). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal transmissora da *Leishmania infantum*, principal agente etiológico da LV (VILELA et al. 2014). A LT é identificada por um conjunto de sintomas que incluem uma úlcera no local de entrada do parasito a qual pode desaparecer sem tratamento ou progredir para várias lesões nodulares disseminadas (leishmaniose cutânea difusa) podendo também aparecer em mucosas (leishmaniose mucosa) (LAINSON, RANGEL, 2005). As principais espécies de *Leishmania* causadoras da LT são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Viannia) guyanensis*.

Dessa forma, as pesquisas sobre flebotomíneos, foram e, são impulsionadas após a suspeita de algumas espécies enquanto transmissoras de patógenos, principalmente, *Leishmania* (SHERLOCK 2003). No Brasil atualmente encontram-se descritas 290 espécies, sendo que destas, 49 já foram registradas no estado do Paraná (SHIMABUKURO et al. 2023). Dentre estas espécies, 19 estão associadas à transmissão do protozoário *Leishmania* spp. (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

O gênero *Crithidia*, um tripanossomatídeo monoxeno, também vem ganhando notoriedade pela importância médica relacionada a espécies de flebotomíneos permissivos à sua transmissão. Até o ano de 2003 o único registro conhecido de infecção por *Crithidia* sp. em flebotomíneos foi notificado por Wallace & Hertig em 1968, em um flebotomíneo da espécie *Lutzomyia sanguinaria* (RANGEL; LAINSON, 2003). Contudo, trabalhos mais recentes identificaram a presença de *Crithidia fasciculata* em flebotomíneos da espécie *Nyssomyia whitmani*, como demonstrado por MACHADO et al. (2017) no estudo conduzido em Palmas, Tocantins, além da detecção molecular de *Blastocrithidia* sp. em flebotomíneos da mesma espécie no Distrito Federal do Brasil (FERREIRA et al., 2015).

Outros estudos também demonstraram a possibilidade de isolamento de *Crithidia* spp. a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de LT e LV (GHOBAKHLOO et al., 2019; KALANTARI et al., 2020; BOUCINHA et al., 2022), indicando que o parasito é capaz de sobreviver à temperatura do corpo humano e infectar células do sistema mononuclear fagocitário. GHOBAKHLOO et al. (2019) detectaram casos de coinfeção por *Leishmania major* e *Crithidia* spp. nas análises de pacientes humanos. No Brasil foi recentemente descrito um caso atípico de coinfeção por protozoários semelhantes à *Crithidia* spp. em um paciente diagnosticado com leishmaniose visceral, no estudo de MARUYAMA et al. (2019). Assim, se faz importante a investigação acerca da infecção por *Crithidia* spp. e a identificação a nível específico destes tripanossomatídeos e de seus possíveis vetores.

Sabidamente, 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).

A região Sul é a região com menor número de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e a menor taxa de incidência média 2,1 casos/100.000 habitantes. Apesar disso, o estado do Paraná figura na 12ª posição em notificações por estado, totalizando n=7.878 casos da doença, porém 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). 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. 2011). A captura desses insetos pode ser realizada no interior de matas, peri e intradomicílios por meio de armadilhas que contenham uma fonte luminosa (para espécies fototrópicas) ou iscas animais (para espécies zoofílicas) (MAROLI et al. 1997). Estudos da fauna de flebotomíneos no estado demonstraram a prevalência da espécie *Ny. neivai* e a presença das espécies *Pintomya fischeri* e *Migonemyia migonei*, prováveis responsáveis pela transmissão de espécies de *Leishmania* causadoras de LT no estado (PITA PEREIRA et al. 2009).

Atualmente, o estado do Paraná está composto 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 no município de Piraquara, área do presente estudo, não há qualquer registro. Ainda, a ecologia desses insetos permanece pobremente caracterizada, principalmente em áreas de Unidades de Conservação. Para suprir essa lacuna, foi realizado o levantamento da fauna de flebotomíneos na região dos 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 das leishmanioses. Além do conhecimento da fauna local, as capturas poderiam propiciar novos registros para o estado do Paraná, com implicações não só na distribuição geográfica destas espécies, bem como para a biodiversidade do grupo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

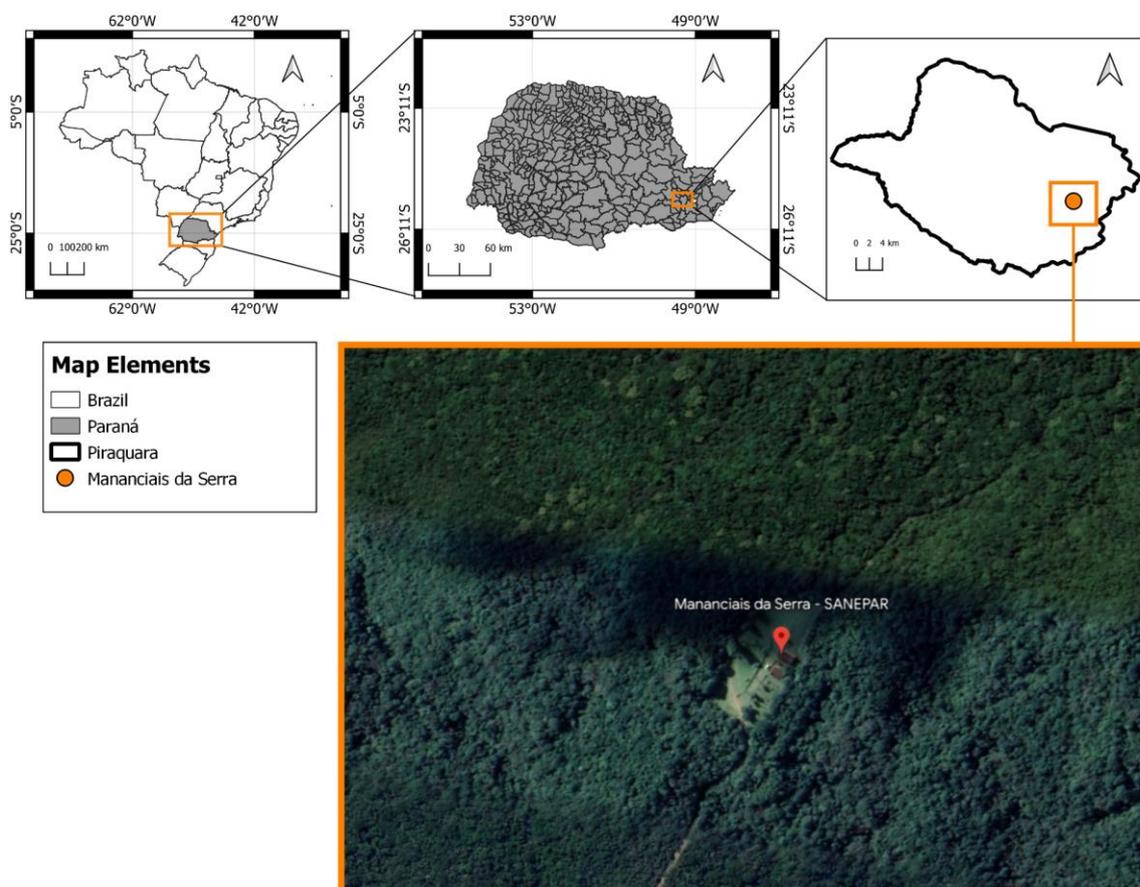
As coletas encontravam-se autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) número 7500-1 (**ANEXO I**) e pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) protocolado sob o número 16.672.846-0 (**ANEXO II**). Os *vouchers* dos espécimes coletados foram depositados na Coleção de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica (ColPar/DPAT) da UFPR (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/co446>).

*Um primeiro relatório parcial (04/07/2022) foi apresentado ao IAT compreendendo 2 períodos de coletas denominados **período 1** que compreendeu os meses de fevereiro, março, abril e novembro de 2021 e **período 2** levando em conta os meses de fevereiro, março, abril e maio de 2022. Anteriormente a estes não houve coletas devido à pandemia de COVID-19 e os dados desse relatório parcial não foram levados em conta na presente análise por não ter sido possível capturas mensais contínuas.*

### ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na região dos Mananciais da Serra (25° 30' 22"S; 45° 01' 41"W) (**Figura 2**), 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, no Parque Estadual do Marumbi (**Figura 2, Figura 3A**). Nos Mananciais encontra-se um dos últimos remanescentes florestais preservados na região metropolitana de Curitiba. 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).



**Figura 2:** Mananciais da Serra localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Parque Estadual do Marumbi, município de Piraquara, estado do Paraná, Brasil (a marcação indica o centro de visitantes do local).

## MÉTODOS DE COLETA

O presente estudo foi realizado entre setembro de 2022 e agosto de 2023 (não houve coleta no mês de junho) totalizando 11 meses, por meio de capturas periódicas de flebotomíneos utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962) (**Figura 3B**), armadilhas de Shannon (SHANNON, 1939) (**Figura 3C**) e de Malaise (MALAISE, 1937) (**Figura 3D**). Foram utilizadas 13 armadilhas luminosas do tipo CDC (Center of Disease Control) que permaneceram ligadas por 12 horas consecutivas (de 18hrs até 06hrs), a uma altura de

aproximadamente 1,5 m do chão e distância de aproximadamente 50 metros entre cada armadilha. O esforço amostral foi de 3.012 horas de captura (sendo excluídas 108 horas de armadilhas que desligaram durante a coleta). As armadilhas CDC foram instaladas estrategicamente em ambientes de circulação de visitantes. As



**Figura 3:** Vista do Pico Estadual do Marumbi (A); armadilha luminosa CDC (B); armadilha de Shannon (C); armadilha de Malaise (D).

capturas na armadilha de Shannon foram realizadas 1 ou 2 vezes por mês em área de mata fechada próxima ao centro de visitação dos Mananciais por 3 horas e os insetos foram capturados utilizando-se um aspirador bucal, totalizando 80 horas de captura. A Malaise, por se tratar de uma armadilha de interceptação de voo de

insetos, permaneceu instalada por 1 mês em área de mata fechada e a retirada dos insetos foi feita a cada mês seguinte de coleta.

O material coletado foi levado até o laboratório de Parasitologia Molecular, no Departamento de Patologia Básica no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Em laboratório os flebotomíneos foram triados, sexados (machos e fêmea) e clarificados usando a seguinte sequência: 24 horas em Hidróxido de Potassa 20%, lavagem rápida com ácido acético 10%, 15 minutos em ácido acético 100%, 15 minutos em álcool 70%, 15 minutos em álcool 90%, 15 minutos em álcool 100% e em seguida imersos em Eugenol por aproximadamente 24 horas (<https://iris.paho.org/handle/10665.2/50524>).

Após clarificados, cada exemplar foi montado entre lâmina e lamínula, sendo os machos montados com o corpo em posição lateral e cabeça em posição ventral. Para as fêmeas, a montagem foi realizada com o tórax e porção inicial do abdome em posição lateral, porção final do abdome em posição ventral e cabeça em posição dorsal. Após montados, cada exemplar foi identificado em nível específica utilizando a chave dicotômica proposta por de GALATI (2018)

## **DISSECÇÃO, MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS FÊMEAS**

As fêmeas coletadas foram dissecadas e somente a cabeça e os três segmentos finais do abdômen foram clarificados e montados em lâmina para identificação a nível de espécie segundo GALATI (2018), enquanto o restante do corpo foi colocado em *eppendorf* com álcool 85% e mantido no freezer a -20°C. As fêmeas acondicionadas foram usadas para a detecção de DNA de protozoários segundo procedimentos descritos abaixo.

## **PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR EXECUTADOS NA UFPR PARA TREINAMENTO DE ESTUDANTE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Os procedimentos relacionados ao treinamento para extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos e detecção de presença de DNA de *Leishmania* spp. foram realizados no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Para a extração de DNA das fêmeas segundo PITA-PEREIRA et al. (2005), foi feita a adição de 10 µL de solução de lise com proteinase K e tampão TE (Tris EDTA) às amostras de flebotomíneos para a extração química, e a maceração das amostras para a extração mecânica. As amostras foram mantidas em banho seco a 56°C por 3 horas, centrifugadas por 5 minutos e realocadas a *ependorfs* novos e identificados após a remoção do sobrenadante. Depois foram levadas ao banho seco a 94°C por 15 minutos para inativação da proteinase K, e centrifugadas por 1 minuto antes de serem armazenadas em freezer.

A extração de DNA foi feita utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA®, Madison, WI, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Foram adicionados 150 µL de tampão Lysis buffer às amostras, transferidas a *ependorfs* com colunas de sílica e centrifugadas por 1 minuto, descartando o líquido ao fundo do tubo. Depois foram adicionados 300 µL de solução de lavagem e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto e o líquido descartado, processo que foi repetido mais duas vezes, seguido da centrifugação dos *ependorfs* somente com a coluna por mais 1 minuto. As colunas foram transferidas para novos *ependorfs* identificados, onde foram adicionados 100 µL de água do kit previamente aquecida a 70°C e, após 3 minutos, as amostras foram centrifugadas por mais 2 minutos. Finalizada a centrifugação as colunas foram descartadas e os *ependorfs* com as amostras de DNA purificado foram mantidos no freezer à temperatura de -20°C.

Amostras teste foram usadas para a amplificação do material genético posterior à extração por PCR Multiplex, onde foram adicionados à reação o DNA extraído de flebotomíneos, os oligonucleotídeos do kDNA do gênero *Leishmania* A: 5' (G/C)(G/C)(C/G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC 3' B: 5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3' (Passos *et al.*, 1996), a enzima Taq polimerase e água. Para controle de extração foram usados os oligonucleotídeos 5Llcac: 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 3Llcac: 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (Lins *et al.*, 2002) do gene constitutivo Cacophony de flebotomíneos. Os *ependorfs* com os mix para PCR foram levados ao termociclador, configurado ao tempo de reação de 1 hora e 50 minutos. As reações ocorreram em volume final de 50 µL de solução, composto por GoTaq® Hot Start Master Mix 1X (Promega), 5 µM de cada *primer*, 5 µL de DNA e água ultrapura e estéril para completar o volume. A ciclagem térmica foi executada

no aparelho modelo GeneAmp® PCR System 9700 e consistiu em 36 ciclos, com a programação por ciclo apresentada na **Tabela 1**, até o esgotamento dos reagentes em fase estacionária de aproximadamente 4°C. Após os ciclos foi adicionado um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1.** Programação por ciclo das etapas de reação de PCR Multiplex para amplificação do material genético de fêmeas da espécie *Pintomyia monticola* (Piraquara, Paraná, Brasil).

Etapa	Tempo	Temperatura
Desnaturação	30 segundos	94°C
Anelamento dos primers	30 segundos	55°C
Extensão das fitas	30 segundos	72°C

Depois de amplificadas, as amostras de DNA foram pipetadas junto com o buffer na placa de pipetagem, e pipetadas no gel de agarose, cujo preparo consistia na pesagem e combinação de 0,3 g de agarose com 30 mL de solução tampão TBE em um Erlenmeyer limpo, aquecido até atingir a homogeneização da solução, onde foram adicionados 10 µL de corante GelRed. O gel foi despejado na cuba montada com as paletas e pente de 8 dentes posicionados, removidos após a solidificação do gel, e a solução tampão foi despejada sobre o gel. Além das amostras de DNA, um marcador de pares de bases (pB) com buffer também foi pipetado no gel. Depois do tempo de corrida do gel, este foi removido da cuba e levado para o equipamento de sistema fotográfico de documentação em gel UVP Bioimaging Systems (Upland, CA, USA), no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Cada etapa do treinamento de detecção foi precedida pela descontaminação dos materiais e ambientes envolvidos, incluindo a autoclavagem das ponteiros usadas nas pipetas e a inserção dos instrumentos em capela com incidência de luz UV por 15 minutos.

## PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR EXECUTADOS NA UFSCAR PARA DETECÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os procedimentos relacionados à detecção da presença de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de fêmeas de flebotomíneos, enviadas em *pools* de 1 a 10 flebotomíneos da mesma espécie, pontos de coleta e data e acondicionadas em álcool 85%, foram realizados no Laboratório de Bioquímica Celular da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, estado de São Paulo, onde foram submetidas a técnicas de PCR convencional para a detecção de *Leishmania* spp., *Crithidia* spp. e Trypanosomatidae. Todas as fêmeas de flebotomíneos analisadas pertenciam à espécie *Pintomyia monticola*.

A extração de DNA segundo PITA-PEREIRA et al. (2005) seguiu o mesmo procedimento, com a maceração mecânica das amostras e adição dos reagentes de digestão do kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA®, Madison, WI, EUA) conforme as indicações do fabricante, em volume final de 275 µL. As amostras foram mantidas em banho seco a 56°C por aproximadamente 4 horas, centrifugadas a 15.000g por 15 minutos e movidas para tubos novos após a remoção do sobrenadante. O procedimento seguiu com a adição de 250 µL de Lysis buffer e centrifugação das amostras por 3 minutos a 15000 g, transferidas à coluna, com posterior adição de 650 µL de solução de lavagem Column Wash Solution (CWS) e centrifugação por 1 minuto a 15000g, processo repetido mais 4 vezes. As colunas foram transferidas para tubos estéreis e identificados, onde foram adicionados a um mix 2 µL de RNase em 250 µL de água do kit previamente aquecida a 65°, usada na eluição do DNA genômico (30 µL). A concentração do material genômico extraído com o kit foi quantificada por espectrofotometria (Nanovue), e o material foi armazenado a -20 °C.

As amostras foram submetidas ao método de PCR convencional, usando os *primers* TRY927/SSU561 (NOYES et al., 1999) e HSP70 (ESPADA et al., 2018) (**Tabelas 2 e 3**), sendo o primeiro para detecção da família Trypanosomatidae e os dois últimos para o gênero *Leishmania*. O DNA da cepa HUUFS14 de *Leishmania infantum* foi usado como controle positivo nas reações de PCR. Os reagentes utilizados para as reações foram Taq DNA polymerase Thermo Scientific (#EP0402) 500U em concentração de 5U/µL, estocados a -20°C, sendo aplicado o tampão 10x

Taq Buffer com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> consistindo em 750 mM Tris-HCl (pH 8.8) e 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>. As reações foram feitas com o volume final de 25 µL para cada reação (Tabela 4).

**Tabela 2.** Descrição e tamanho dos iniciadores (*primer*) usados no método de PCR convencional para amplificação do material genético de fêmeas da espécie *Pintomyia monticola* (Piraquara, Paraná, Brasil).

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Tamanho	Identificação
TRY Fw	GAAACAAGAAACACGGGAG	927 pb	Família Trypanosomatidae
TRY Rv	CTACTGGGCAGCTTGAA	927 pb	Família Trypanosomatidae
SSU Fw	TGGGATAACAAAGGAGCA	561 pb	Família Trypanosomatidae
SSU Rv	CTGAGACTGTAACCTCAAAGC	561 pb	Família Trypanosomatidae
HSP70 Fw	GGACGCCGGCAGATTCT	1286 pb	Gênero <i>Leishmania</i>
HSP70 Rv	CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC	1286 pb	Gênero <i>Leishmania</i>

**Tabela 3.** Condições de ciclagem para amplificação do material genético extraído de fêmeas da espécie *Pintomyia monticola* (Piraquara, Paraná, Brasil).

<i>Primer</i>	Ciclagem
TRY/SSU	Desnaturação: 3 minutos a 94°C (uma vez). Desnaturação, anelamento e extensão inicial: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C (ciclo de 30 vezes). Extensão final: 10 minutos a 72°C.
HSP70	Desnaturação: 4 minutos a 94°C (uma vez). Desnaturação, anelamento e extensão: 50 segundos a 94°C, 60 segundos a 57°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C (ciclo de 35 vezes). Extensão final: 7 minutos a 72°C.

**Tabela 4:** Reagentes para reação de sequenciamento das amostras de fêmeas de *Pintomyia monticola* (Piraquara, Paraná, Brasil) para volume de 25 $\mu$ L.

Reagente	Concentração total do reagente	Volume para uma reação	Concentração final em uma reação
Buffer	10x	2,5 $\mu$ L	1x
dNTP mix	2mM	2,5 $\mu$ L	0,2 mM
Forward <i>primer</i>	10 $\mu$ M	1,0 $\mu$ L	0,4 $\mu$ M
Reverse <i>primer</i>	10u $\mu$ M	1,0 $\mu$ L	0,4 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4,0 $\mu$ L	4 mM
Template DNA	-	3,0 $\mu$ L	-
Taq DNA Polymerase	5U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	0,05 U/ $\mu$ L
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	10,75 $\mu$ L	-
Volume total	-	25,00 $\mu$ L	-

Posteriormente as amostras foram enviadas para sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER; COULSON, 1975) no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP). As reações para sequenciamento de cada amostra consistiram em 3,2 pmol/ $\mu$ L de *primer* forward direto, sendo o volume de produtos de PCR purificados de TRY927/SSu561 com massa entre 10 a 20 ng e água para biologia molecular ajustada para um volume final de 7  $\mu$ L. O Kit de Sequenciamento de Ciclo BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 (Applied Biosystems) foi utilizado para o sequenciamento pelo método de Sanger, realizado pelo Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Para as análises e a construção da árvore filogenética foi usado o programa Mega6 (TAMURA et al., 2013), usando como grupos externos espécies do gênero *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Crithidia*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

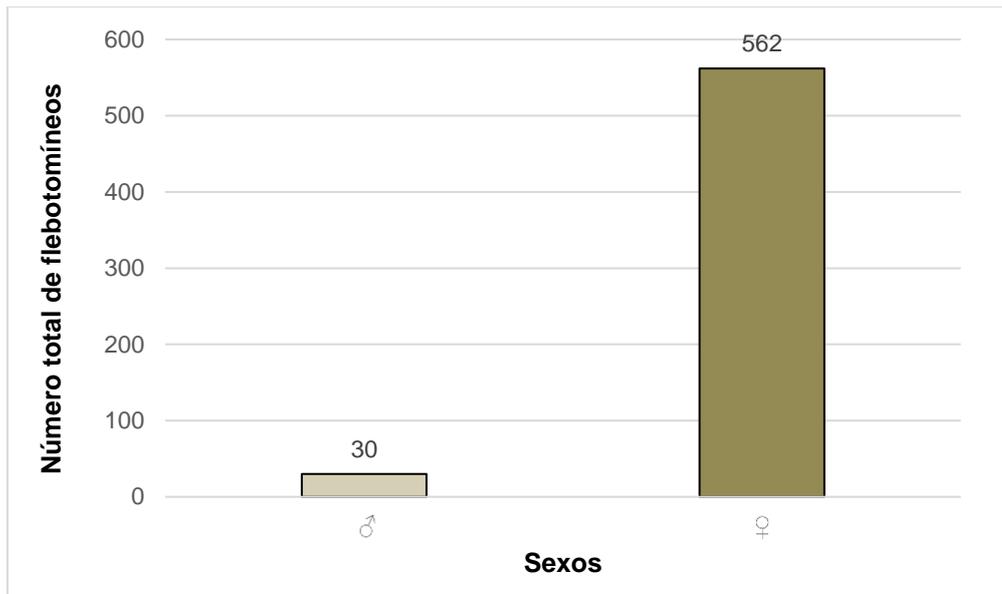
### FAUNA FLEBOTOMÍNICA DOS MANANCIAIS DA SERRA

Durante o período de estudo foram capturados 592 espécimes (**Tabela 5**), sendo 562 fêmeas (95%) e 30 machos (5%) com uma relação M/F de 19:1 (**Figura 4**). Embora o número de fêmeas tenha sido consideravelmente maior que o número de machos, estes foram responsáveis pela maior diversidade de espécies (**Tabela 1**). Dentre os espécimes capturados, foram identificadas 9 espécies distribuídas em 6 gêneros, *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia* e *Psathyromyia*. O gênero *Brumptomyia* foi o mais diverso com 3 espécies: *Brumptomyia troglodytes* (14 espécimes), *Br. bragai* (3 espécimes) e *Br. ortizi* (1 espécime). Duas fêmeas e dois machos de *Brumptomyia* foram identificados apenas até o nível genérico devido às condições do material. A espécie *Pintomyia monticola* foi a mais frequente e abundante totalizando 559 espécimes, o que correspondeu a 94% da fauna encontrada. De *Evandromyia edwardsi* foram capturados 3 espécimes. As espécies *Br. bragai*, *Psathyromyia ribeirensis* (2 espécimes) e *Migonemyia vaniae* (2 espécimes) foram registradas pela primeira vez no estado do Paraná. Das espécies de flebotomíneos registradas na região Sul, 49 (18% do total) já foram encontradas no estado do Paraná (SHIMABUKURO et al. 2017), diversidade mais elevada que dos estados de Pernambuco (ANDRADE, DANTAS-TORRES et al. 2010) e de Goiás e Distrito Federal

**Tabela 5:** Espécies de flebotomíneos\* coletadas Mananciais da Serra localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Parque Estadual do Marumbi, município de Piraquara, estado do Paraná, Brasil, entre os meses de 2022 e 2023.

Anos/ Meses	2022								2023												TOTAL	TOTAL	TOTAL		
	Setembro		Outubro		Novembro		Dezembro		Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio		Julho					Agosto	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂				♀	♂
<i>Brumptomyia bragai</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
<i>Brumptomyia ortizi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Brumptomyia sp.</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
<i>Brumptomyia troglodytes</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	14
<i>Evandromyia edwardsi</i>	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
<i>Migonemyia vaniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Pintomyia monticola</i>	1	0	147	0	146	0	0	0	37	3	15	1	6	0	120	0	81	0	2	0	1	0	4	556	560
<i>Psathyromyia lanei</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	2	
<i>Psathyromyia ribeirensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>150</b>	<b>0</b>	<b>147</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>37</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>1</b>	<b>81</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>562</b>	<b>592</b>

\* as espécies foram capturadas em área de mata e borda de mata utilizando armadilhas do tipo CDC, Shannon e Malaise.



**Figura 4:** Número total espécimes, machos e fêmeas, de flebotomíneos coletados Mananciais da Serra localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Parque Estadual do Marumbi, município de Piraquara, estado do Paraná, Brasil, entre os meses de 2022 e 2023.

(RAPELLO et al. 2018). A ocorrência de *Br. bragai* já era descrita nos estados de São Paulo e Santa Catarina (GALATI et al. 2018), estados limítrofes. O registro da espécie nos Mananciais da Serra fecha uma lacuna de distribuição da espécie entre a região Sudeste e Sul do Brasil. *Psathyromyia ribeirensis* e *Mg. vaniae* possuíam foram descritas do estado de São Paulo (SÁBIO et al. 2014, GALATI 2018) e cujo registro era único, para suas localidades-tipo, até o presente estudo. A presença dessas três espécies nos Mananciais da Serra aumentou para 52 o número de flebotomíneos registrados no Paraná, ressaltando a importância da área de estudo na diversidade da fauna do estado.

Entre as armadilhas, a CDC permitiu a captura de uma maior diversidade de flebotomíneos (7 espécies), seguida pela Shannon (3 espécies) e pela Malaise (1 espécie), ressaltando-se a importância de utilizar diferentes métodos de captura em inventários de fauna de flebotomíneos. O mês de janeiro de 2023 foi onde observou-se uma maior diversidade de espécies (n = 6). Por outro lado, mesmo possuindo um menor esforço amostral, a armadilha de Shannon permitiu a captura do maior número de espécimes (415 flebotomíneos), em particular da espécie *Pi. monticola*.

Na maioria dos casos, fêmeas de *Pi. monticola* são capturadas em maior número que machos, corroborando os achados do presente estudo, cuja somatória

totalizou 556 espécimes. Trata-se de uma espécie antropofílica e tem sido encontrada se alimentando no ser humano dentro de florestas, mesmo durante o dia. Embora tenha-se pouco conhecimento sobre sua biologia e ecologia, segundo ANDRADE e GURGEL-GONÇALVES (2015), ela é menos frequente que outras espécies capturadas na mesma área. Porém, os resultados do presente estudo não corroboram essa observação, visto que 94,6% dos flebotomíneos encontrados nos Mananciais pertenciam a essa espécie. Ainda cabe destacar que a Shannon é armadilha de busca ativa do flebotomíneo, expondo o pesquisador à captura e atraindo as fêmeas dessa espécie que são muito antropofílicas (ANDRADE, GURGEL-GONÇALVES 2015), o que também explicaria que somente fêmeas foram capturadas.

Chama atenção ainda a ocorrência da espécie *Ny. neivai*, embora somente um exemplar macho tenha sido capturado. DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Ny. neivai*, utilizando PCR, já foi relatada nos estados de Minas Gerais (MARGONARI et al. 2010) Santa Catarina (MARCONDES et al. 2009), Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA et al. 2009) e Paraná (OLIVEIRA et al. 2011). *Nyssomyia neivai* também foi descrita naturalmente infectada em Tucumán, Argentina (LANÚS et al. 2006). DNA de *Le. infantum chagasi* (SARAIVA et al. 2009) e *Le. braziliensis* (PITA-PEREIRA et al. 2009) já foram identificados na espécie. Dentre as espécies implicadas na transmissão do parasito na região Sul, *Ny. neivai* apresenta maior distribuição geográfica (SILVA et al. 2008). Desde 2002, casos autóctones de LT por *L. braziliensis* já haviam sido registrados nos arredores da cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul), em áreas de vegetação. Assim como, a infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp., implicaram *Ny. neivai* como principal transmissora de *L. braziliensis* no Paraná (PITA-PEREIRA et al. 2009; SANTOS et al. 2016).

As informações sobre as demais espécies são muito escassas na literatura, principalmente pela não importância relatada em saúde pública. De acordo com FORATTINI (1973) e AGUIAR e VIEIRA (2018), o gênero *Brumptomyia* está associado a tocas de tatus e animais silvestres, não apresentando hábito antropofílico. Pouco se conhece sobre a biologia e ecologia das espécies, embora saiba-se que estas não sejam antropofílicas. *Evandromyia edwardsi* é frequentemente registrada em ambientes de mata, áreas marginais, abrigos de animais silvestres e ambientes rochosos (CASTELO et al., 2015) ocorrendo nos

estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (GALATI 2018). A espécie já foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis* em área com casos de leishmaniose visceral canina no município de Cotia, região da grande São Paulo. No Rio de Janeiro, *Ev. edwardsi* também já foi encontrada com *Wuchereria bancrofti*, nematoide causador da filariose linfática (ALVES et al. 2022). Nada se conhece sobre a biologia e ecologia de *Pa. ribeirensis* e *Mg. vaniae* e as informações na literatura trata-se apenas de suas descrições.

## ANÁLISES MOLECULARES DOS FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS

Foram analisadas 18 amostras em *pools* de fêmeas da espécie *Pintomyia monticola* (**Figura 5**), totalizando 84 flebotomíneos, como mostrado na **Tabela 6**. As amostras 16 e 17 tiveram amplificação, usando os *primers* TRY927/SSU561 (**Figura 6**). O *primer* HSP70 foi aplicado para confirmação do gênero *Leishmania* sp., porém não houve amplificação. Após o sequenciamento dos *pools* que amplificaram, foi detectada a presença de DNA de *Crithidia* sp. na amostra de número 17, com duas fêmeas de *Pi. monticola*, se tratando do primeiro relato da presença de *Crithidia* sp. nessa espécie de flebotomíneo, e o primeiro registro desse gênero de protozoário para a região Sul do Brasil. Ainda cabe destacar que, considerando a filogenia, é possível se tratar de uma nova espécie de *Crithidia* (**Figura 7**).

A detecção de tripanossomatídeos em flebotomíneos é resultado principalmente de estudos sobre as leishmanioses, sendo poucos os registros de flagelados monoxenos detectados comparados aos de *Leishmania* sp. (RANGEL; SHAW, 2018). O primeiro registro conhecido de detecção de *Crithidia* sp. em um flebotomíneo foi feito por WALLACE e HERTIG em 1968, e dentre os demais registros não se conhecia a detecção destes tripanossomatídeos em flebotomíneos da espécie *Pintomyia monticola*. Assim, apesar de não ter sido detectado DNA de *Leishmania* sp., a detecção de *Crithidia* sp. em fêmeas da espécie *Pintomyia monticola* no presente trabalho se faz muito relevante considerando ser o primeiro registro do protozoário monoxeno nessa espécie de flebotomíneo, que é conhecidamente antropofílica e potencialmente transmissora de leishmaniose tegumentar. Ainda de acordo com RANGEL e SHAW (2018), os registros de tripanossomatídeos monoxenos em flebotomíneos brasileiros se restringem a estados das regiões norte,

nordeste, centro-oeste e sudeste, sendo apresentado neste trabalho o primeiro registro de *Crithidia* sp. para a região sul do Brasil.

Não se sabe de flebotomíneos são capazes de transmitir espécies de *Crithidia* como já comprovado para culicídeos (CLARCK et al., 1964) e já isolados do sistema digestório de ceratopogonídeos (KAEWMEE, et al. 2023).

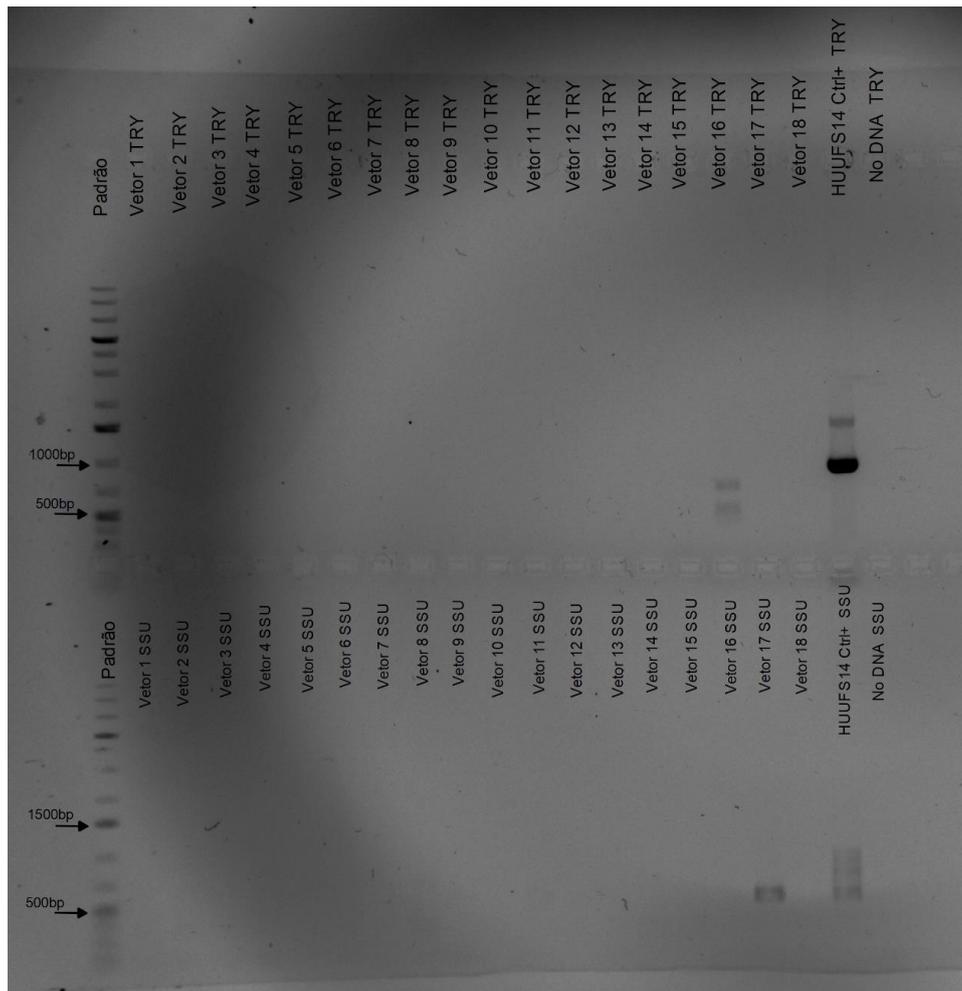


**Figura 5.** Fêmea de *Pintomyia monticola* pousada na armadilha de Shannon.

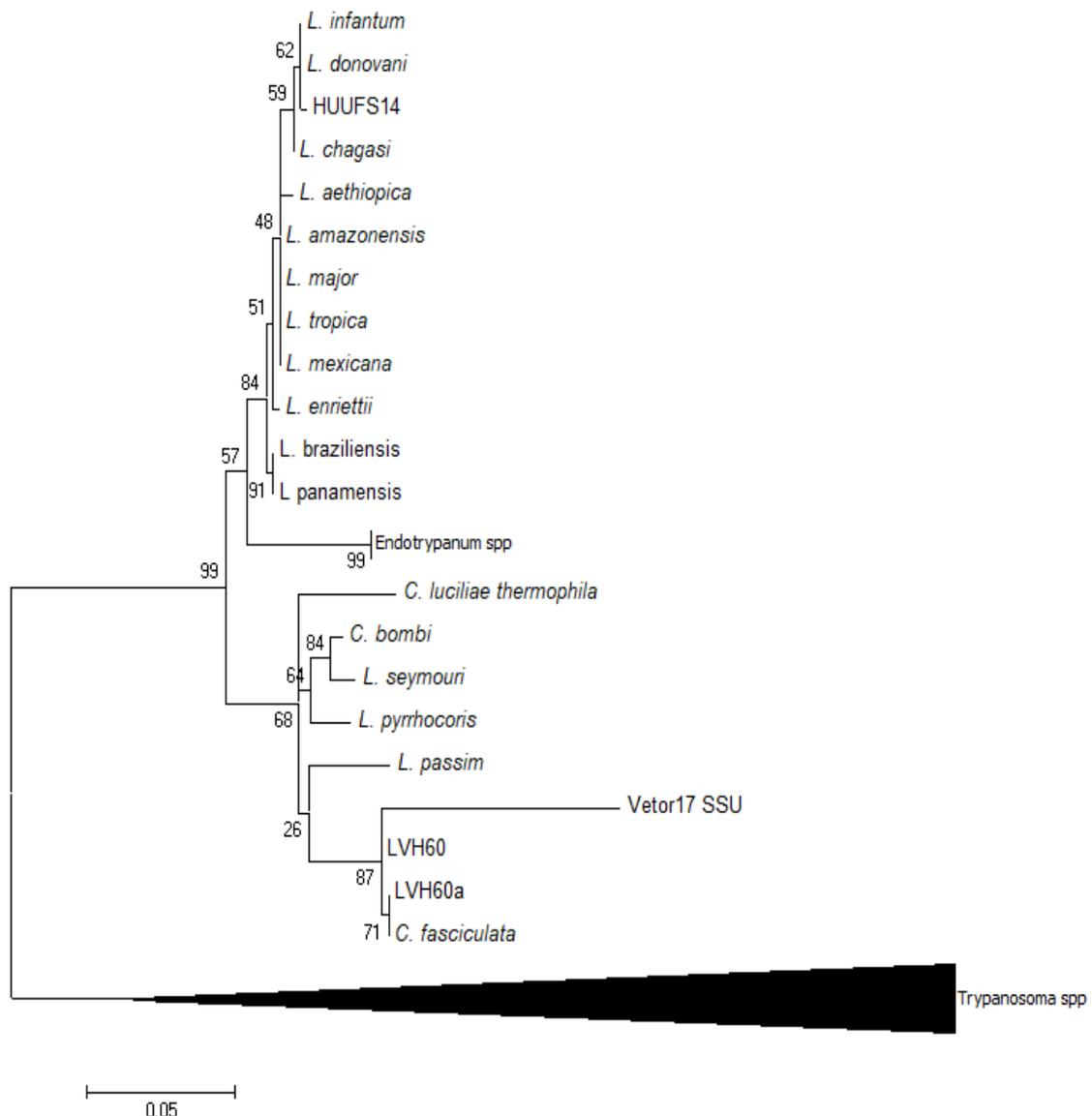
**Tabela 6.** Pools de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Pintomyia monticola* (Piraquara, Paraná, Brasil) analisados para detecção de tripanossomatídeos.

Amostra	Ponto de coleta	Número de flebotomíneos por pool
1	PT_02_CDC_17/03	3
2	PT_03_CDC_17/03	4
3	PT_04_CDC_17/03	2
4	PT_05_CDC_17/03	5
5	PT_06_CDC_17/03	5
6	PT_07_CDC_17/03	4
7	Shannon_16/03	1
8	Shannon_PT_661_16/03	10
9	MASEPR_06_CDC_16/03	2
10	MASEPR_04_CDC_carroça	1
11	MASEPR_01_CDC_24/04	7
12	MASEPR_01_CDC_21/04	3
13	MASEPR_02_CDC_20/04	3
14	Shannon_MASEPR_1__21/04	15
15	MASEPR_06_CDC_21/04	12
16	MASEPR_02_CDC_21/04	2
17	MASEPR_07_CDC_21/04	2
18	MASEPR_08_CDC_21/04	3

Legenda: MASEPR: Mananciais da Serra, Paraná; CDC: armadilha luminosa; Shannon: armadilha luminosa. CDC: PT: ponto.



**Figura 6.** Produto de PCR de TRY927 e SSU561 das amostras dos 18 vetores, com amplificação nas amostras de Vetor 16 (amostra 16) TRY927 e Vetor 17 (amostra 17) SSU561. Gel de agarose fotografado em aparelho ChemiDoc™ XRS+ Systems (Bio-Rad) e nomeado pelo software Image Lab™ 3.0.



**Figura 7.** Análises filogenéticas de seqüências de *ssrRNA* da amostra do Vetor 17. A barra inferior indica 0,05% de divergência de nucleotídeos. A árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança (ML) baseado no modelo Tamura-Nei (1993), usando seqüências de nucleotídeos de *Leishmania* spp. recuperadas do NCBI de acordo com os resultados do BLAST-N. Os números próximos aos galhos representam a porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste bootstrap (1.000 réplicas). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas aplicando o método Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,5345)). **HUUFS14** cepa de referência para *L. infantum*. Os isolados **LVH60** e **LVH60a** são as cepas *Crithidia*-like do caso atípico do estudo de MARUYAMA et al. (2019). As análises evolutivas foram realizadas no MEGA6.

Por outro lado, o número crescente de casos de coinfeção por *Leishmania* sp. e *Crithidia* sp. em pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar e visceral (GHOBAKHLOO et al., 2019; KALANTARI et al., 2020; BOUCINHA et al., 2022) se torna uma preocupação considerando que a coinfeção significa a capacidade de sobrevivência do protozoário à temperatura do corpo humano e replicação no hospedeiro, e é mais um indicativo da relevância do presente estudo, que apresenta novos dados relativos à infecção por *Crithidia* spp. em insetos vetores. A árvore filogenética proposta sugere a possibilidade da descoberta de uma nova espécie de *Crithidia* ainda desconhecida pela ciência, um resultado significativo considerando que a detecção de novas espécies de protozoários permite inferir sobre diferentes aspectos que permeiam a saúde pública, como a interação hospedeiro-parasito e o desenvolvimento de novos tratamentos ou medidas de prevenção e controle doenças.

O maior coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar está associado à presença de flebotomíneos em determinada região, como proposto por REBÊLO et al. (2010) no estudo conduzido no entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, uma importante área de ecoturismo no município de Barreirinhas, Maranhão. De acordo com os autores, o aumento da área de ocorrência da doença no município está relacionado com o maior número de registros de flebotomíneos na região, inclusive nos limites do parque. Sendo assim, a relevância da detecção de DNA de *Crithidia* sp. em flebotomíneos coletados nos Mananciais da Serra, Piraquara, está relacionada com a caracterização da unidade como uma área de ecoturismo, com altos índices de visitação, além de estar próxima à comunidade local em uma Área de Proteção Ambiental (APA), podendo significar a exposição da população à infecção.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível observar que a maior ocorrência de flebotomíneos foi referente à espécie antropofílica *Pintomyia monticola*, sendo que a sua maior concentração se deu na área de maior circulação na entrada dos Mananciais da Serra, onde ocorre a recepção e cadastro dos visitantes no parque, expondo-os à possíveis picadas das fêmeas. Pode-se observar a existência de uma maior variedade de fauna nas áreas internas de maior preservação dos Mananciais da Serra, sem

registro de outras espécies antropofílicas ou de possíveis riscos aos visitantes. Durante o período de coleta foram encontradas três espécies com primeiro registro no Paraná, sendo elas a *Br. bragai*, *Pa. ribeirensis* e *Mg. vaniaae*, aumentando a diversidade de fauna de 49 para 52 espécies mostrando a importância do estudo da área. A investigação acerca da detecção de tripanossomatídeos em flebotomíneos coletados em uma área de ecoturismo, reunindo como resultados a detecção de uma nova espécie de *Crithidia* sp. registrada pela primeira vez em flebotomíneos da espécie *Pintomyia monticola*, espécie vetora suspeita de protozoários causadores de leishmaniose tegumentar, sendo o primeiro registro do tripanossomatídeo monoxeno para a região sul do Brasil. Estes resultados são importantes complementações para o conhecimento existente sobre a transmissão da leishmaniose, apresentando novos elementos relativos aos protozoários infectantes e seus vetores. A localização da coleta dos flebotomíneos infectados em uma área de ecoturismo inserida em uma APA reforça a necessidade de monitoramento e elaboração de medidas preventivas, e o número crescente de casos de coinfeção por *Leishmania* sp. e *Crithidia* sp. em pacientes humanos destaca a importância de estudos mais aprofundados sobre a interação hospedeiro-parasito e possíveis implicações clínicas.

A pesquisa realizada permitiu a apresentação de trabalhos em três eventos científicos (3º LeishSul, CBZ e 14ª SIEPE), sendo que neste último uma das apresentações foi premiada. Ainda, as coletas de espécimes da família Psychodidae permitiu, até o momento, duas publicações sendo uma delas onde descrevemos uma nova espécie, denominada *Trichomyia marumbi* (nominada em homenagem ao parque) e o compartilhamento de amostras de *Pintomyia monticola*, possibilitando a colaboração com pesquisadores de diferentes partes do Brasil. Estes produtos serão detalhados abaixo e os comprovantes enviados em anexo a esse relatório.

## PRODUTOS GERADOS PELA PESQUISA NOS MANANCIAIS DA SERRA

### ARTIGOS PUBLICADOS

- 1- Carvalho, Lucas R.; Pinho, Luiz C., Andrade, Andrey J. ***Trichomyia* Haliday in Curtis (Diptera: Psychodidae) from southern Brazil: four new species and seven new records.** ZOOTAXA, v. 5536, p. 432-446, 2024.
- 2- Rodrigues, Bruno L.; Oliveira, Alessandra G.; Da Silva, Leonardo E. H.; Vasconcelos dos Santos, Thiago; Oliveira, Lidiane N.C; Dutra-Rêgo, Felipe; Andrade, Andrey J.; Maia, Glédson B, Souza Pinto, Israel; Andrade Filho, José Dilermando; Galati, Eunice A.B. **Hidden diversity in anthropophilic sand flies of the *Monticola* Series (Diptera, Psychodidae).** Scientific Reports, v. 14, p. 27215, 2024.

### RESUMOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 1- Carvalho, Lucas R.; Benetti, Clara; Pinho, Luiz C.; Andrade, Andrey J. **Primeiros registros da subfamília *Bruchomyiinae* Alexander, 1921 (Diptera: Psychodidae) para o estado do Paraná.** In: XXXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2024, Porto de Galinhas. v. 35. p. 423-423.
- 2- Gusso, Mariana F.; Benetti, Clara; Carvalho, Lucas R.; Morelli, Letícia C.; Chaves Junior, Salvador P.; Gomes, Ellen; Maruyama, Sandra R. C.; Andrade, Andrey J.; Takamiya, Nayore T. **Circulation of *Crithidia* Léger, 1902 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) detected at first time in *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in an ecotourism area in the Paraná State, Brazil.** In: 3º Simpósio de Leishmanioses da Região Sul, 2023, Florianópolis.
- 3- Benetti, Clara; Gusso, Mariana F.; Carvalho, Lucas R.; Morelli, Letícia C.; Chaves Junior, Salvador P.; Andrade, Andrey J. **Inventory of the sand fly**

**fauna in an ecotourism area of the Paraná state: preliminary results.** In: 3º Simpósio de Leishmanioses da Região Sul, 2023, Florianópolis.

- 4- Clara Benetti De Lemos Cordeiro participou como Apresentador(a), do trabalho intitulado **Estrutura populacional de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) nos Mananciais sa Serra, Piraquara, Brasil**, da 14ª SIEPE – SEMANA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO da Universidade Federal do Paraná (30ª EVINCI), realizada no período de 16 a 20 de outubro de 2023.
- 5- Mariana Funchal Gusso participou como Apresentador(a), do trabalho intitulado **Deteção de Tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) coletados em área de ecoturismo**, da 14ª SIEPE – SEMANA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO da Universidade Federal do Paraná (30ª EVINCI), realizada no período de 16 a 20 de outubro de 2023.

#### PREMIAÇÃO

- 1- **Deteção de tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) coletados em área de ecoturismo** com autoria de Mariana Funchal Gusso, sob a orientação do(a) professor(a) Andrey Jose de Andrade, foi classificado em 1º LUGAR na EVINCI/EINTI BANCA 088-BIOLÓGICAS da 14ª SIEPE – SEMANA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO da Universidade Federal do Paraná (30ª EVINCI), realizada no período de 16 a 20 de outubro de 2023.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G.M.; VIEIRA, V.R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. In: RANGEL, E. F.; SHAW, J.J. (ed.). **Brazilian Sand Flies: biology, taxonomy, medical importance, and control**. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALVES, J. R. C.; MENEZES, R. C.; VILELA, M. L.; MALLET, J. R. C. First report of *Lutzomyia edwardsi* and *Lutzomyia gasparviannai* Infected by nematodes in a Rio de Janeiro cave. **International Journal of Zoology and Animal Biology**, v. 5, n. 2, 00361, p. 1 - 4, 2022.
- ANDRADE, A.J.; DANTAS-TORRES F. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**. v. 39, p. 115-123, 2010.
- ANDRADE, A.; GURGEL-GONÇALVES, R. New record and update on the geographical distribution of *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America. **Check List**, v. 11, n. 2, p. 1–6, 2015.
- BARRETTO. M.P. **Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae)**. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 162p., 1943.
- BAUM M.; DE CASTRO EA.; PINTO MC.; GOURLAT, T. M.; BAURA, W.; KLISOWIKS, D. R.; RIBEIRO, M. C. V. 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**. v. 143, p. 8- 12, 2015.
- BENNAI, K.; TAHIR, D.; LAFRI, I.; BENDJABALLAH-LALIAM, A.; BITAM, I.; PAROLA, P. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006513, 2018.
- BOUCINHA, C.; ANDRADE-NETO, V. V.; ENNES-VIDAL, V.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; TORRES-SANTOS, E. C.; D'AVILA-LEVY, C. M. A Stroll Through the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12:804707, 2022.
- BRAY, D.P.; CARTER, V.; ALVES, G.B.; BRAZIL, R.P.; BANDI, K.K.; HAMILTON, J.G. Synthetic sex pheromone in a long-lasting lure attracts the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 weeks in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 3, p. e2723, 2014.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. **Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana**. Em: CONCEIÇÃO SILVA, F.; ALVES, C. R. (Eds.) Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. pp. 193-200. ISBN 978-85-7541-568-9, 2014.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; FILHO-ANDRADE, J. D. Sand fly vectors of leishmania in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research**, v. 4, n. 144, p. 2161-0983.1000144, 2015.

CASTELO N.O.; NASCIMENTO, A.C.P.; OLIVEIRA, R.C.; MARQUES. S.; GONÇALVES, E.F.B.; GALATI E.A.B. Fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) em parques do município de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. **Boletim epidemiológico paulista**. v. 12, p. 1-9, 2015.

CAVIGLIONE, J.H. et al. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina, IAPAR, 2000. 1 CD-ROM.

CLARK, T.B.; KELLEN, W.R.; LINDEGREN, J.E.; SMITH, T.A. The transmission of *Crithidia fasciculata* Leger 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson). **Journal of Protozoology**, v. 11:400–402, 1964.

COURTENAY, O.; PETERS, N.C.; ROGERS, M.E.; BERN, C. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 10, p. e1006571, 2017.

DE SOUZA, M. A.; DE FRANÇA NUNES, R. F.; VIANA, T. C.; MEDEIROS MARINHO, M. J. de; MOREIRA, P. V. S. de Q.; PEREIRA, W. O. Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**. v. 10, n. 2, p. 62–70, 2012.

ESPADA, C. R.; ORTIZ, P. A.; SHAW, J. J.; BARRAL, A. M. P.; COSTA, J. M. L.; ULIANA, S. R. B.; COELHO, A. C. Identification of *Leishmania* (*Viannia*) species and clinical isolates of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 genes reveals some unexpected observations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91(4), p. 312-318, 2018.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. 18: 71-80, 2004.

FERREIRA, T. S.; MINUZZI-SOUZA, T. T. C.; ANDRADE, A. J.; COELHO, T. O.; ROCHA, D. A.; OBARA, M. T.; HECHT, M.; NITZ, N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48(6), P. 776-779, 2015.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: **Editores Edgar Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo**. 658 pp, 1973.

GALATI, E.A.B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas.** Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.132p. 2018. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>

GHOBAKHLOO, N.; MOTAZEDIAN, M. H.; NADERI, S.; EBRAHIMI, S. Isolation of *Crithidia* spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24(1), p. 116-126, 2019.

GUIMARÃES-SILVA, E.; SILVA, S.O.; RIBEIRO DA SILVA, R.C.; PINHEIRO, V.C.S.; REBÊLO, J.M.M., MELO M.N. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 24, n.12, p: e0179052, 2017.

KALANTARI, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; ASGARI, Q.; SOLTANI, A. DNA-based detection of *Leishmania* and *Crithidia* species isolated from humans in cutaneous and post-kala-azar dermal leishmaniasis from Shiraz and

KAEWMEE, S.; MANO, C.; PHANITCHAKUN, T.; AMPOL, R.; YASANGA, T.; PATTANAWONG, U.; JUNKUM, A.; SIRIYASATIEN, P.; BATES, P.A.; JARIYAPAN, N. Natural infection with *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* supports *Culicoides peregrinus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a potential vector of leishmaniasis and characterization of a *Crithidia* sp. isolated from the midges. **Frontiers in Microbiology**, v.14, p.1235254, 2023.

LANUS, E.C; GROSSO, M.L; PINERO; J.E; VALLADARES, B; SALOMON, O.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern argentina **Acta Tropica**, v.98 ,p.1-5, 2006.

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

LEONEL, J.A.F. **Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo.** (Dissertação) Mestrado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná.** Rio de Janeiro: Livraria José Olympio, 442 p.1981.

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, N.B. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**. v.18, p. 67-74, 2008.

MACHADO, T. D. O.; MINUZZI-SOUZA, T. T. C.; FERREIRA, T. S.; FREIRE, L. P.; TIMBÓ, R. V.; VITAL, T. E.; NITZ, N.; SILVA, M. N.; JUNIOR, A. S. S.; SALES, N. M.

C.; OBARA, M. T.; ANDRADE, A. J.; GURGEL-GONÇALVES, R. The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential *Leishmania* spp. vectors in the Brazilian savanna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112(10), 2017.

MALAISE, R. A new insect trap. **Entomologisk Tidskrift**.58: 148–160, 1937.

MARCONDES, C.B.; BITTENCOURT, I.A.; STOCO, P.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C. STEINDEL, M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.103, n. 11, p.1093-1097, 2009.

MARCONDES C.B; SANTOS-NETO L.G e LOZOVEI A.L. Ecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Floresta Atlântica do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.51-55, 2011.

MARGONARI, C.; SOARES, R. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; XAVIER, D. C.; SARAIVA, L.; FONSECA, A. L.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, M. E.; BORGES, E. C.; SANGUINETTE, C. C.; MELO, M. N. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47(6), p. 1212-1219, 2010.

MAROLI, M.; FELICIANGLI, M. D.; ARIAS, J. Métodos de captura, Conservacion y Montaje de los Flebotomos (Diptera: Psychodidae). **OPS/OMS/HCP/HCT/95/97**, Washington. 72 p, 1997.

MELO, H.A.; TEODORO, D.F.R.U. Effect of vegetation on cutaneous leishmaniasis in Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo**, v. 113: p.1 70505, 2018.

MARUYAMA, S. R.; SANTANA, A. K. M.; TAKAMIYA, N. T.; TAKAHASHI, T. Y.; ROGERIO, L. A.; OLIVEIRA, C. A. B.; MILANEZI, C. M.; TROMBELA, V. A.; CRUZ, A. K.; JESUS, A. R.; BARRETO, A. S.; SILVA, A. M.; ALMEIDA, R. P.; RIBEIRO, J. M.; SILVA, J. S. Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25(11), 2019.

NASCIMENTO, B. W. L.; SARAIVA, L.; NETO, R. G. T.; SERRA E MEIRA, P. C. L.; SANGUINETTE, C. C.; TONELLI, G. B.; BOTELHO, H. A.; BELO, V. S.; SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in the central-western state of Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 125(3), p. 262-268, 2013.

NOYES, H. A.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp in wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 29(2), p. 331-339, 1999.

OLIVEIRA D.M; REINHOLD-CASTRO K.R; BERNAL M.V.Z; OLIVEIRA LEGRIFON C.M; CAMPANA LONARDONI M.V.C; TEODORO U, e SILVEIRA T.V. Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the State of Parana´,

Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v.11, p.137-143,2011.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRAZIL, R. P.; BERTHO, A. L.; BARBOSA, A. F.; BRITTO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99(12), p. 905-913, 2005.

RAPELLO A.; ANDRADE A.J.; ROCHA, D.A.; FERREIRA, J.C.B.; TIMBÓ, R.V.; OBARA, M.T.; GURGEL-GONÇALVES, R. An updated list of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the Federal District of Brazil. **CheckList** 14 (1): 213–224, 2018.

REBÊLO, J. M. M.; ASSUNÇÃO JÚNIOR, A. N.; SILVA, O.; MORAES, J. L. P. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26(1), 2010.

REGINATO, M.; GOLDENBERG, R. Análise florística, estrutural e fitogeográfica da vegetação em região de transição entre as Florestas Ombrófilas Mista e Densa Montana, Piraquara, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 34, n. 3, p. 349–360, 2007.

SÁBIO P.B.; ANDRADE A. J.; GALATI E.A.B. Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni Complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**. v. 51, p. 331-341, 2014.

SANGER, F. & COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94(3), p. 441–448, 1975.

SANTOS B.A; REINHOLD-CASTRO K.R; CRISTÓVÃO E.C; SILVEIRA T.G e TEODORO U. Sand flies on Paraná River Islands and natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* in Southern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.41, p.186-189, 2016.

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

SHERLOCK, I. A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F., LAINSON, R. (Ed.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003, p. 15-21.

SARAIVA L.; CARVALHO G.M.L; GONTIJO C.M.F; QUARESMA P.F; LIMA A.C.V.M.R; FALCÃO A.L e ANDRADE FILHO J.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.46, p.1159-1163,2009.

SILVA, K.B.; SILVINO, A.C.S.; OLIVEIRA, J.S.; SOUSA-PAULA, L.C.; DIAS, R.V.; BRAGA, P.E.T. Flutuação sazonal e frequência horária de flebotomíneos numa área urbana de Sobral, Ceará, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 13, n. 1, p. 12-20, 2018.

STRUMINSKI, E. Parque Estadual do Pico do Marumbi. Curitiba: **Ed. UFPR**, p. 179, 2001.

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

SHIMABUKURO P.H.F.; ANDRADE, A.J.; GALATI, E.A.B. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/3297>>. Acesso em: 04 Abr. 2023

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution. **Biota Neotropica**. v. 11, p: 686-704, 2011.

SILVA A.M; DE CAMARGO N; DOS SANTOS D.R; MASSAFERA R ; FERREIRA A.C ; POSTAI C; CRISTÓVÃO E.C ; KONOLSAISEN J.F ; BISELTO A.J; PERINAZO R ;TEODORO U e GALATI E.A.B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v.37, p.209-225, 2008.

SUDIA, W.D. e CHAMBERLAIN, R.W. Battery operated light trap, an improved model. **Mosquito News**. 22:126-9, 1962.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30(12), p. 2725-2729, 2013.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10(3), p. 512-526, 1993.

TEODORO, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no Norte do estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 27: 242-249, 1993.

TEODORO, U. et al. Light and hems as attraction factors of *Nyssomyia whitmani* in a rural area, Southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. 41: 383-388, 2007.

UZCÁTEGUI, V. S. et al. Phlebotomines ( Diptera : Psychodidae ) from a Urban Park of Belém, Pará State, Northern Brazil and Potential Implications in the Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**. v. 57, n. September 2019, p. 281–288, 2020.

VILELA, M.L.; AFONSO, M.M.; COSTA, S.M.; COSTA, W.A.; RANGEL, E.F. ***Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: fatores associados ao processo de expansão e urbanização da leishmaniose visceral americana.** Em: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Eds.) *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. pp. 183-192. ISBN 978-85-7541-568-9. 2014.

## ANEXO I



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75000-3	Data da Emissão: 17/06/2022 12:17:03	Data da Revalidação*: 01/04/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Andrey José de Andrade	CPF: 042.450.886-99
Título do Projeto: Realização do projeto de pesquisa intitulado "Estrutura populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual Pico do Marumbi, Piraquara, estado do Paraná, Brasil" no período de 2020 a 2024.	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná	CNPJ: 75.095.679/0001-49

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Sazonalidade das espécies; análises moleculares (Leishmania e sangue); comportamento das espécies.	08/2021	08/2022
2	Fornecer ao IAP e a SANEPAR; confecção de um documento técnico para os órgãos públicos	12/2023	12/2024
3	Definição dos pontos de coleta; Periodicidade das espécies; comparação das armadilhas.	06/2020	06/2021
4	Análises ecológicas; ritmo nictemeral das espécies mais abundantes, estrutura populacional local.	10/2022	10/2023



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75000-4	Data da Emissão: 14/05/2023 06:11:53	Data da Revalidação*: 01/04/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Andrey José de Andrade	CPF: 042.450.886-99
Título do Projeto: Realização do projeto de pesquisa intitulado "Estrutura populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual Pico do Marumbi, Piraquara, estado do Paraná, Brasil" no período de 2020 a 2024.	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná	CNPJ: 75.095.679/0001-49

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Sazonalidade das espécies; análises moleculares (Leishmania e sangue); comportamento das espécies.	08/2021	08/2022
2	Fornecer ao IAP e a SANEPAR; confecção de um documento técnico para os órgãos públicos	12/2023	12/2024
3	Definição dos pontos de coleta; Periodicidade das espécies; comparação das armadilhas.	06/2020	06/2021
4	Análises ecológicas; ritmo nictemeral das espécies mais abundantes, estrutura populacional local.	10/2022	10/2023

## ANEXO II



### RENOVAÇÃO DE PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARANÁ

<b>Número da autorização:</b> 09.20	<b>Data de emissão:</b> 07/07/2022
<b>Protocolo:</b> 16.672.846-0	

#### Dados do pesquisador e da pesquisa:

<b>Nome:</b> Andrey José de Andrade	
<b>RG:</b> 9163430	<b>CPF:</b> 042.450.886-99
<b>Título do projeto:</b> Estrutura Populacional De Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) No Parque Estadual Pico Do Marumbi, Piraquara, Estado Do Paraná, Brasil	

#### Unidade(s) de Conservação:

Parque Estadual Pico do Marumbi
---------------------------------