

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

**INVESTIGAÇÃO DA COMUNIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA,
PSYCHODIDAE) EM DIFERENTES AMBIENTES ECOLÓGICOS VISANDO O
MONITORAMENTO E CONTROLE DAS LEISHMANIOSES**

por

Débora Cristina Capucci

Belo Horizonte

2021

TESE/DISSERTAÇÃO MCS-IRR

D.C. CAPUCCI

2021

DÉBORA CRISTINA CAPUCCI

**INVESTIGAÇÃO DA COMUNIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA,
PSYCHODIDAE) EM DIFERENTES AMBIENTES ECOLÓGICOS VISANDO O
MONITORAMENTO E CONTROLE DAS LEISHMANIOSES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração Transmissores de Patogénos.

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Coorientação: Dr. Carina Margonari de Souza

Belo Horizonte

2021

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

C175i
2021

Capucci, Débora Cristina.

Investigação da comunidade de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em diferentes ambientes ecológicos visando o monitoramento e controle das leishmanioses / Débora Cristina Capucci. – Belo Horizonte, 2021

XVII, 127 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 101-125

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

1. Leishmaniose/prevenção e controle 2. Epidemiologia 3. Vigilância de vetores I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Margonari, Carina de Souza (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

DÉBORA CRISTINA CAPUCCI

**INVESTIGAÇÃO DA COMUNIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA,
PSYCHODIDAE) EM DIFERENTES AMBIENTES ECOLÓGICOS VISANDO O
MONITORAMENTO E CONTROLE DAS LEISHMANIOSES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Transmissores de Patógenos.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Felipe Dutra Rêgo (IRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Raquel Aparecida Ferreira (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Data defesa: 26/05/2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas maravilhosas na jornada da realização desse trabalho, bem como também ter me abençoado durante todo o processo.

Agradeço ao meu Pai e minha irmã por todo apoio incondicional, carinho e amor. A minha mãe (in memoriam) por toda educação e amor. Obrigada por sempre acreditarem em mim e em meus objetivos de vida.

Aos meus orientadores José Dilermando Andrade e Carina Margonari pelas orientações e grandes ensinamentos que contribuíram para meu crescimento acadêmico científico e intelectual, pelo carinho, paciência e atenção, sempre dispostos a me auxiliar em qualquer momento. Agradeço a confiança depositada em mim nesses anos e por toda amizade. Vocês terão sempre a minha grande admiração e respeito.

A Dra. Aldenise Martins Campos pelo auxílio em todas as etapas desse estudo, pelas contribuições nas análises estatísticas e por todo carinho, conversas e ensinamentos.

Ao Vladimir Diniz por todo auxílio em todas as etapas de geoprocessamento e produção de mapas.

Ao João Vitor Reis Soares por toda ajuda durante as etapas do estudo, por todas as conversas, carinho e abraços, você foi essencial para realização desse trabalho.

À Camila Binder Soares de Souza pela ajuda constante nas etapas de extração e técnicas moleculares, por todo apoio, conversas e amizade.

À Mariana Alves Lima por toda ajuda e apoio.

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo pelos ensinamentos e carinho.

À Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro por todo conhecimento compartilhado, pelas conversas, ajuda e carinho, sempre disposta a ajudar.

À Júlia, Flávia e Carol, por sempre estarem dispostas para o que precisasse.

À Dra. Thais Bonifácio Campolina por toda amizade, incentivo e apoio.

A todos do Grupo de Estudos em Leishmanioses por todo ensinamento, carinho, apoio, incentivo e momentos de descontração e amizade. A companhia e ajuda de vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até o final.

A todos meus amigos, em especial a Jessica Vilela e Amanda Teodoro, que de alguma forma ajudaram e me apoiaram.

As todos os moradores de Pains, sempre muito amorosos e acolhedores.

A Prefeitura Municipal de Pains, Secretaria Municipal de Saúde e em especial ao João de Oliveira Costa (João da Merenda) por todo auxílio necessário durante os trabalhos de campo, pela amizade e carinho.

Ao Instituto René Rachou e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) pelo financiamento do estudo.

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

RESUMO

As modificações antropogênicas no uso da terra ameaçam os ecossistemas naturais dos flebotomíneos e de alguns mamíferos, promovendo a adaptação desses insetos e hospedeiros silvestres aos ambientes urbanizados. Com isso, as leishmanioses vêm apresentando modificações no padrão epidemiológico e expansão geográfica. O município de Pains/MG possui como suas principais atividades econômicas a mineração de calcário, agricultura e pecuária que alteram o uso do solo da região. O presente estudo teve como objetivo correlacionar dados entomológicos, epidemiológicos e geográficos compreendendo a dinâmica dos flebotomíneos em diferentes ecótopos no município. As coletas entomológicas foram realizadas mensalmente no período de agosto de 2018 a julho de 2019, utilizando armadilhas luminosas CDC, modelo HP, distribuídas em 30 pontos em sete regiões ecológicas: mata nativa, caverna, plantações de eucalipto, mineração de calcário, distrito (vila), áreas urbanas e fazendas (currais e pocilga). Foram capturados 1.352 flebotomíneos, compreendendo 701 fêmeas e 551 machos, pertencentes a 12 gêneros e 24 espécies. As espécies mais abundantes foram *Evandromyia edwardsi* (17.08%), *Evandromyia lenti* (15.68%), *Micropygomyia quinquefer* (11.31%) e *Nyssomyia whitmani* (7.7%). Entre os ambientes estudados, a maior abundância de indivíduos foi observada nos ambientes de mata (26.1%), fazenda (23.67%) e caverna (20.12%). Entre as espécies capturadas, quatro são comprovadas como vetores de *Leishmania*: *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai* e *Nyssomyia whitmani*; e foram registradas em todos os ambientes. Foi encontrada uma similaridade entre os ecótopos, indicando que todos possuem importância para manutenção da comunidade de flebotomíneos. Do total de 664 (94,72%) fêmeas não alimentadas destinadas a técnica de PCR direcionada ao alvo ITS1, 47 (7.08%) exemplares apresentaram DNA de *Leishmania*: *Brumptomyia* sp., *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia edwardsi*, *Evandromyia lenti*, *Lutzomyia longipalpis*, *Micropygomyia quinquefer*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia pessoai*, *Psathyromyia lutziana* e *Sciopemyia sordellii*. A distribuição espacial dos flebotomíneos se mostrou equilibrada em em todo o município, apresentando maior abundância em ambientes de mata nativa e ambientes que apresentam fragmentos de mata próximos. Os resultados destacam o perfil

epidemiológico complexo no município que apresentam características epidemiológicas adequadas para a transmissão e expansão das leishmanioses em todos os ambientes. Ressalta -se a importância da elaboração de estratégias de vigilância adequadas juntamente com a educação em saúde da população.

Palavras-chave: Flebotomíneos; Diversidade; Leishmanioses; Epidemiologia

ABSTRACT

Anthropogenic changes in land use threaten the natural ecosystems of sand flies and some mammals, promoting the adaptation of these insects and hosts to urbanized environments. As a result, leishmaniasis has shown changes in the epidemiological pattern and geographical expansion. The municipality of Pains, MG, has as its main economic activities the mining of limestone, agriculture and livestock that change the land use in this region. The present study aimed to correlate entomological, epidemiological and geographic data to understand the dynamics of sand flies in different ecotopes in the municipality. Entomological collections were carried out monthly from August 2018 to July 2019, using CDC light traps, HP model, distributed in 30 points in seven ecological regions: native forest, cave, eucalyptus plantations, limestone mining, district (village), urban areas and farms (corrals and pigsty). 1,352 sand flies were captured, comprising 701 females and 551 males, belonging to 12 genera and 24 species. The most abundant species were *Evandromyia edwardsi* (17.08%), *Evandromyia lenti* (15.68%), *Micropygomyia quinquefer* (11.31%) and *Nyssomyia whitmani* (7.7%). Among the studied environments, the greatest abundance of individuals was observed in the forest (26.1%), farm (23.67%) and cave (20.12%). Were captured four species incriminated as *Leishmania* vectors: *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani*, and were registered in all environments. A similarity was found between the ecotopes, indicating that they are all important for maintaining the sand fly community. A total of 664 (94.72%) non-fed females destined for the PCR technique directed to the ITS1 target, 47 (7.08%) specimens presented the presence of *Leishmania* DNA: *Brumptomyia* sp., *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia edwardsi*, *Evandromyia lenti*, *Lutzomyia longipalpis*, *Micropygomyia quinquefer*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia pessoai*, *Psathyromyia lutziana* and *Sciopemyia sordellii*. The spatial distribution of sand flies proved to be very homogeneous throughout the municipality, showing greater abundance in native forest environments and environments that present fragments of forest close by. The results highlight the complex epidemiological profile in the municipality, which presents adequate epidemiological characteristics in all environments for the transmission and expansion of leishmaniasis, making it

important to develop appropriate surveillance strategies together with the health education of the population.

Key- words: Phlebotomine, Diversity, Leishmaniasis, Epidemiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas do protozoário do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 2 - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.	21
Figura 3: Classificação de Áreas de Transmissão da Leishmaniose Visceral no Estado de Minas Gerais – 2020.	32
Figura 4: Localização do município de Pains, Minas Gerais.	37
Figura 5: Armadilhas luminosas do tipo CDC dispostas nos sete ecótopos no município de Pains, Minas Gerais. A - Armadilha disposta no ambiente de perímetro urbana em uma bananeira; B - Armadilha disposta no ambiente de fazenda próximo à porcos e cavalos; C - Armadilha disposta no ambiente de mata nativa, D – Armadilha disposta no ambiente de caverna em zona afótica; E- armadilha disposta no ambiente de plantação de eucalipto; F- armadilha disposta no ambiente de mineração próximo aos maquinários; G- armadilha disposta no ambiente de distrito próximo ao galinheiro.	40
Figura 6: Distribuição das armadilhas utilizadas nas coletas no município de Pains/MG.....	41
Figura 7: Escalonamento multidimensional Não Métrico - NMDS usando matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e Jaccard calculada com os dados de ocorrência e abundância relativa das espécies de flebotomíneos coletados entre diversos ambientes (ambiente de caverna, mata nativa, plantação de eucalipto, ambiente de mineração, fazenda, distritos e perímetro urbano).	69
Figura 8: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados da PCR ITS1 a partir das fêmeas individuais de flebotomíneos coletadas nos meses de agosto e setembro no município de Pains/MG.	73
Figura 9: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados da PCR RFLP para identificação das espécies de <i>Leishmania</i> das fêmeas individuais de flebotomíneos coletadas nos meses de agosto e setembro no município de Pains/MG.	74

Figura 10: Mapa de classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, derivados do processamento de imagens do satélite CIBERS 2 de 2019	76
Figura 11: Mapa de distribuição espacial da densidade de flebotomíneos e presença de flebotomíneos positivos para DNA de <i>Leishmania</i> sobreposto a classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019.....	77
Figura 12: Mapa de distribuição espacial da densidade de flebotomíneos vetores comprovados de transmissão no ciclo de LV (<i>Lutzomyia longipalpis</i>) e presença de flebotomíneos positivos para DNA de <i>Leishmania</i> sobreposto a classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019.....	79
Figura 13: Distribuição espacial da densidade de flebotomíneos vetores comprovados de participarem no ciclo de transmissão de LTA (<i>Nyssomyia whitmani</i> , <i>Nyssomyia neivai</i> , <i>Migonemyia migonei</i>) e presença de flebotomíneos positivos para DNA de <i>Leishmania</i> sobreposto a classificação da cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019.	80

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Porcentagem das espécies de flebotomíneos coletados nos sete ecótopos no município de Pains/Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019. 54
- Gráfico 2: Relação de parâmetro climáticos na abundância das espécies de flebotomíneos coletadas no período de agosto de 2018 a julho de 2019 em Pains, Minas Gerais. 60
- Gráfico 3: Ocorrência relativa das espécies de flebotomíneos no município de Pains, Minas Gerais, de acordo com a porcentagem de ocorrências em cada ecótopos do estudo 65
- Gráfico 4: Ocorrência relativa das espécies de flebotomíneos no ambiente de caverna, de acordo com a porcentagem de ocorrências em cada zona de distribuição das armadilhas (Entrada, Interior 1 e Interior 2). 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Caracterização ambiental e localização geográfica dos pontos de coleta realizada no município de Pains/MG, no período de agosto de 2018 e julho de 2019.

..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos registrados e notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral no município Pains, Minas Gerais, no período de 2001 a 2019.	35
Tabela 2: Espécies de flebotomíneos e número de machos e fêmeas coletados com armadilha do tipo CDC, modelo HP, nos 30 pontos de coleta no município de Pains/Minas Gerais no período de agosto de 2018 a julho de 2019.	53
Tabela 3: Total de flebotomíneos coletados no município de Pains/MG no período de agosto de 2018 a julho de 2019, segundo os pontos de coleta.	56
Tabela 4: Distribuição mensal dos flebotomíneos coletados em Pains/MG no período de agosto de 2018 a 2019.....	58
Tabela 5: Total de flebotomíneos coletados e índice de constância de espécies encontradas em Pains/MG	59
Tabela 6: Abundância de espécies de flebotomíneos distribuídas nos ambientes de caverna, distrito, plantação de eucalipto, fazenda, mata, mineradora e perímetro urbana no município de Pains/MG, durante o período de agosto de 2018 a julho de 2019.	62
Tabela 7: Abundância de espécies de flebotomíneos distribuídas no ambiente de caverna nas zonas de entrada, penumbra (Interior 1) e afótica (Interior 2) no município de Pains/MG, durante o período de agosto de 2018 a julho de 2019	66
Tabela 8: Índice de diversidade Shannon-Weaver (H') e equitabilidade de Pielou (J), da fauna de flebotomíneos encontrados nos sete ambientes do estudo no município de Pains, Minas Gerais	68
Tabela 9: Fêmeas de flebotomíneos analisadas por meio da técnica de PCR e taxa de infecção no município de Pains/MG no período de agosto de 2018 a julho de 2019.	71
Tabela 10: Distribuição dos flebotomíneos positivos para DNA de Leishmania por espécie e ecótopos no município de Pains, Minas Gerais nos meses de agosto de 2018 a julho de 2019.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL – Microlitro

Br – *Brumptomyia*

COLFLEB - Coleção de Flebotomíneos do Instituto René Rachou

Cyt b - Citocromo b

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNT - Doença Tropical Negligenciada

dNTP - Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

Ev – *Evandromyia*

Ex – *Expapillata*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

IRR - Instituto René Rachou

ITS1 - Internal Transcribed Spacer 1

km² - quilometro quadrado

KOH – Hidróxido de potássio

LC - Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

Le – *Leishmania*

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu – *Lutzomyia*

LV – Leishmaniose Visceral

Mg – *Migonemyia*

MG - Minas Gerais

Mi - *Micropygomyia*

NMDS - Escalonamento Multidimensional Não Métrico

Ny - *Nyssomyia*

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pa – *Psathyromyia*

Pb - Pares de bases

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

Pi – *Pintomyia*

PPD - Derivado proteico purificado

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

rpm – Rotação por minuto

Sc - *Sciopemyia*

SIG - Sistema de informação geográfica

SIG – Sistema Geográfico de Informação

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

UV - Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Leishmanioses	18
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	20
1.3 Leishmaniose Visceral	23
1.4 Flebotomíneos	24
1.5 Impactos ambientais	27
1.6 Geoprocessamento.....	28
1.7 Município de Pains, Minas Gerais.....	29
1.8 Leishmanioses no município de Pains, Minas Gerais	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 Área de estudo.....	37
4.2 Delineamento do estudo	38
4.2.1 Estudo entomológico	38
4.2.2 Processamento dos flebotomíneos coletados	44
4.2.3 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos	45
4.3 Métodos moleculares para Identificação de <i>Leishmania</i> sp.....	46
4.3.1 Extração do DNA das fêmeas não alimentadas	46
4.3.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer (ITS1)	47
4.3.3 Identificação da Espécie de <i>Leishmania</i> por PCR RFLP	48
4.4 Dados climáticos	48
4.5 Geoprocessamento.....	48
4.5.1 Caracterização do uso e ocupação do solo no município de Pains ..	48
4.5.2 Análise espacial – Mapas temáticos	49
4.5.3 Análise Fauna Flebotomínea	49

4.6 Análise estatística	50
5. RESULTADOS	52
5.1 Composição da fauna de flebotomíneos.....	52
5.2 Fauna flebotomínica coletada nos diferentes ecótopos: Mata, plantação de eucalipto, urbano, distrito, mineração, fazenda e caverna.	61
5.3 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em fêmeas de flebotomíneos	700
5.4 Geoprocessamento	75
6. DISCUSSÃO	81
6.1 Geoprocessamento: Distribuição espacial dos flebotomíneos e o uso e classificação do solo no município de Pains	94
7. CONCLUSÃO.....	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

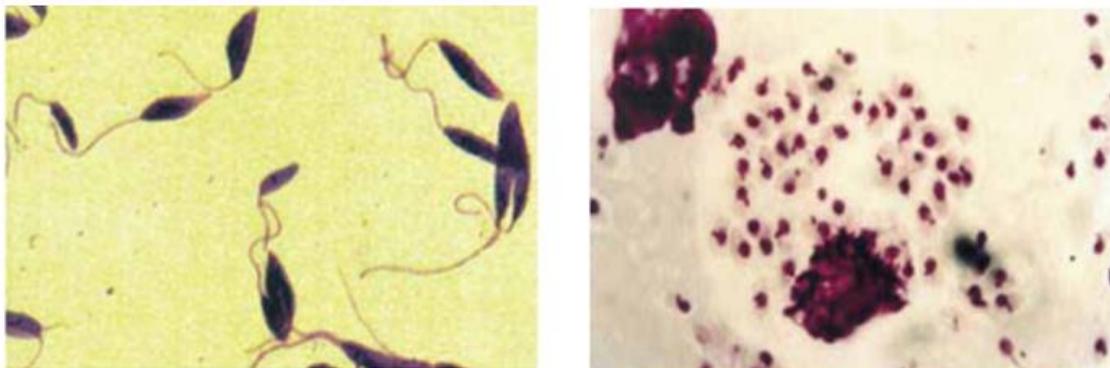
1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas parasitárias, causadas por protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* Ross, 1903. São classificadas como antropozoonoses, que acometem animais silvestres, domésticos e seres humanos e são transmitidos através da picada das fêmeas hematófagas de flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) (BRASIL, 2017; DESJEUX 1996; FORATTINI, 1973; GALATI et al., 2003).

Esses protozoários heteróxenos se reproduzem dentro do organismo de um hospedeiro e exibem duas formas durante seu ciclo biológico, promastigota e amastigota (Figura 1), sendo que a primeira forma é encontrada no trato intestinal dos insetos (flebotomíneos) e a segunda forma encontrada em hospedeiros e reservatórios vertebrados no interior das células do sistema monolítico fagocitário (GONTIJO & CARVALHO, 2003; LAINSON & SHAW, 1987; PIMENTA et al., 2013).

Figura 1: Formas do protozoário do gênero *Leishmania*.



A - Forma promastigota encontrada no hospedeiro invertebrado (Flebotomíneos); B - Forma amastigota encontrada no hospedeiro vertebrado (Mamíferos).

Fonte: Brasil, 2017.

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 54 espécies, excluindo as espécies sinônimas, sendo que aproximadamente 31 delas possuem capacidade parasitária em mamíferos e 20 espécies são patogênicas de seres humanos no Novo mundo, representando importância para saúde pública (ANVERSA, 2018;

AKHOUNDI et al., 2016; AKHOUNDI et al., 2017; ASHFORD, 2000; BRAZIL et al., 2015; LAISON, 2010).

As espécies que são patogênicas aos seres humanos podem ser classificadas em três subgêneros: *Viannia*, *Leishmania* e *Mundinia*. Espécies do subgênero *Viannia* possuem desenvolvimento peripilário, apresentando uma fase de desenvolvimento no piloro, espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* possui seu desenvolvimento suprapilário, ocorrendo estritamente nos intestinos anterior e médio do inseto (AKHOUNDI et al., 2017; DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012; ESPINOSA et al., 2018; LAINSON e SHAW, 1987).

No Brasil atualmente existem em circulação oito espécies de *Leishmania*, duas do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*, que já foram isoladas e identificadas em pacientes humanos (ANVERSA, 2018; BRAZIL, 2015; LAISON, 2010), sendo elas:

- Subgênero (*Leishmania*)

Leishmania (L.) infantum Nicolle, 1908 e *Leishmania (L.) amazonensis* Laison e Shaw, 1972;

- Subgênero (*Viannia*)

Leishmania (V.) braziliensis Vianna, 1911, *Leishmania (V.) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira et al, 1987, *Leishmania (V.) naiffi* Laison e Shaw, 1989, *Leishmania (V.) shawi* Laison et al, 1989, *Leishmania (V.) lindenbergi* Silveira et al., 2002.

As leishmanioses podem se manifestar de forma variável, sendo classificada em visceral e cutânea, sendo a última dividida em cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e cutânea disseminada; as manifestações clínicas estão associadas a diferentes espécies de *Leishmania* e imunologia do hospedeiro (AKHOUNDI et al., 2016; ASHFORD, 2000; COSTA & SOUZA, 2018; DESJEX, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), sendo uma das dez doenças mais graves quando analisada sua prevalência e expansão geográfica,

representando grande importância para saúde pública mundial (WHO, 2020; OPAS, 2020).

Com uma distribuição mundial, as leishmanioses são endêmicas em 97 países nos trópicos, subtropicais e bacia mediterrânea que possuem cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. Desses países, 69 são endêmicos para ambas as formas clínicas, 78 endêmicos apenas para leishmaniose visceral (LV) e 88 endêmicos para leishmaniose tegumentar (LT) (WHO, 2020).

Atualmente mais de 12 milhões de casos de leishmanioses já foram registrados no mundo de acordo com a OMS, e estima-se o registro de 1,5 a 2 milhões de casos notificados anualmente nas diferentes formas clínicas, 0,5 milhões de casos notificados para LV e 1-1,5 milhões casos de LT. Essa patologia é caracterizada pela diversidade de vetores e reservatórios e pela sua complexidade epidemiológica (ALMEIDA et al., 2010; ALVAR et al., 2012; AKHOUNDI et al., 2016; BRASIL, 2017; DESJEUX, 2004; OPAS, 2020).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar (LT) é considerada pela OMS uma das principais doenças tropicais negligenciadas de importância à saúde pública, devido sua ampla distribuição geográfica, sendo registrada em 88 países distribuídos em quatro continentes: Américas, Ásia, África e Europa; e devido ao seu amplo espectro de manifestações clínicas (ANVERSA et al., 2018; ASHFORD, 2000; BRASIL, 2017; DESJEUX, 2004; WHO, 2020).

A LT é uma doença infecciosa causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, que apresenta diversas manifestações clínicas (Figura 2): A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais predominante no Brasil, caracterizada pelo acometimento primário da pele com a presença de uma lesão única ou múltipla. Causada geralmente pelos protozoários *Le. amazonensis*, *Le. guyanensis*, *Le. braziliensis* e nas regiões norte e nordeste do Brasil, são causadas pelos protozoários *Le. guyanensis*, *Le. lainsoni*, *Le. naiffi*, *Le. shawi* e *Le. lindenbergi* (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2017; BRAZIL et al., 2015; DESJEUX, 2004; LAISON, 2010; WHO, 2020).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é causada principalmente por *Le. braziliensis*, e apresenta como manifestação clínica lesões na região mucosa do nariz, boca, podendo atingir a laringe. Já a leishmaniose cutânea difusa (LCD) constitui a forma mais grave e rara, causada pela *Le. amazonensis*, apresenta formas cutâneas disseminadas pelo corpo, com múltiplos nódulos não ulcerados (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2017; BRAZIL et al., 2015; DESJEUX, 2004; LAISON, 2010).

Figura 2 - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.



A - Leishmaniose tegumentar apresentando úlcera única na perna; **B** - Leishmaniose tegumentar disseminada apresentando numerosas úlceras na perna; **C** - Leishmaniose mucocutânea apresentando lesão mucosa nasal com ulcerações

Fonte: Brasil, 2017.

No Brasil a leishmaniose tegumentar americana (LTA) está presente em todas as regiões do país, e em virtude de sua ampla distribuição e formas clínicas é considerada uma das doenças dermatológicas que requerem cuidado, isso devido ao alto risco de deformidades causadas às pessoas, podendo gerar transtornos psicológico (BRASIL, 2017; GOTO & LINDOSO, 2010; MURRAY et al., 2005).

Originalmente a LTA era caracterizada restritamente como infecções zoonóticas localizada em ambientes florestais, acometendo seres humanos acidentalmente quando esses adentravam em ambientes silvestres para realizar trabalhos ou a lazer. Nos últimos anos o perfil epidemiológico dessa doença vem sofrendo alterações em sua transmissão devido às alterações ambientais causadas pelo homem, fatores climáticos e intensa urbanização não planejada. Vetores responsáveis pela transmissão dessa patologia estão demonstrando capacidade adaptativa, sendo encontrados em ambientes rurais e periurbanos, favorecendo a

expansão e ocorrência de novos casos humanos (BRASIL, 2017; MOKNI, 2019; PIMENTA et al., 2012; RANGEL et al., 2014).

Sua transmissão ocorre através de flebotomíneos vetores, sendo os principais e que possuem ampla distribuição geográfica: *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*. As espécies *Psychodopygus wellcomei*, *Psychodopygus complexus*, *Bi flaviscutellata*, *Nyssomyia umbratilis*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Psychodopygus ayrozai* e *Nyssomyia antunesi* também participam da transmissão, mas possuem distribuição geográfica restrita. Outras espécies de flebotomíneos foram registradas naturalmente infectadas ou com a presença de DNA de *Leishmania*, mas não são incriminadas como vetores, necessitando de mais estudos para o conhecimento delas acerca da transmissão (BRAZIL et al., 2015; CARVALHO et al., 2008; DE SOUZA et al., 2006; GONTIJO & CARVALHO, 2003; GUIMARÃES et al., 2014; LAINSON, 2010; LEITE, 2015; MARGONARI et al., 2006; PINHEIRO et al., 2013; RANGEL & LAINSON, 2009; RANGEL et al., 2018; RÊGO et al. 2015; SANGUINETTE et al., 2015; SARAIVA et al., 2009, 2010; SILVA, 2019).

Os Parasito associados à LTA possuem como principais reservatórios, animais silvestres de diferentes ordens, tais como Rodentia, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulada, Carnívora, Primata e Chiroptera que podem participar como reservatórios silvestres e sinantrópicos, se aproximando de humanos, elevando o risco de transmissão em áreas rurais e peridomicílios (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; DE CASTRO et al., 2017; DE LIMA et al., 2002; DE REZENDE et al., 2017; LIMA et al., 2013; MADEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2017; QUARESMA et., 2005; ROQUE & JANSEN, 2014; SHAPIRO et al., 2013; TONELLI et al., 2017).

Existem registros de presença de *Le. braziliensis* em animais domésticos como cães e equídeos (BRILHANTE et al., 2016; DANTAS-TORRES, 2007; MADEIRA et al., 2005; MHADHBI, 2020; SOARES et al., 2013), mas o papel epidemiológico desses animais ainda não está elucidado (REITHINGER & DAVIES, 1999). Estudos indicam que os cães não apresentam características de reservatório, sugerindo uma infectividade acidental no ambiente silvestre, assim como ocorre com humanos (CASTRO et al., 2007; MADEIRA et al., 2005). Mas seu papel necessita ser esclarecido uma vez que no ambiente periurbano, esses animais podem servir como fonte alimentar de vetores, servindo como atração (DANTAS-TORRES, 2007).

1.3 Leishmaniose Visceral

A LV concentra 90% de seus casos notificados em seis Países, sendo eles: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. Nas Américas, essa patologia divide três cenários apresentando endemismo em 12 países. Na Bolívia, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Costa Rica, Uruguai e Nicarágua são caracterizados como países de transmissão esporádica, a Colômbia e Venezuela possuem a transmissão de LV estável ou controlada. Já os países: Brasil, Argentina e Paraguai apresentam expansão geográfica da LV (ALVAR et al., 2012; OPAS, 2020).

Em 2018, o Brasil registrou 97% dos casos de LV ocorridos nas Américas, estando presente em 21 das 27 Unidades Federais distribuídas em todas as regiões e em 25% dos municípios do país. Sendo considerada a forma mais grave das leishmanioses é uma patologia de grande desafio para saúde pública devido à sua elevada incidência, dificuldade de diagnosticar, ao alto índice de óbito decorrentes da doença e crescente ampliação geográfica (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2010; DANTAS-TORRES et al., 2006; DESJEUX, 2004; HARHAY et al., 2011; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; WHO, 2020).

No Brasil a Leishmaniose Visceral possui como agente etiológico a *Leishmania (L.) infantum* (ALVAR et al. 2004; DANTAS-TORRES et al., 2006b; LAISON, 2010), que é transmitido pela espécie *Lutzomyia longipapisi*, considerada a principal espécie vetor de transmissão de LV. A espécie *Lutzomyia cruzi* é comprovada como vetor em áreas geográficas específicas dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do sul. Estudos recentes indicam que a espécie *Migonemyia migonei* possa participar da transmissão de *Le. infantum*, devido a sua alta densidade em localidades em que as espécies vetores estão ausentes, mas com registro da doença (ALEXANDRE et al., 2020; CARVALHO et al., 2010; DOS SANTOS et al., 1998; GUIMARÃES et al., 2016; HARHAY et al., 2011; LAISON e RANGEL, 2005; SOUZA et al. 2003).

No ambiente silvestre os principais reservatórios de LV são canídeos como as raposas *Cerdocyon thous* e *Lycolopex vetulus* (DEANE, 1956; DEANE & DEANE, 1954; LAINSON et al., 1990; LUPPI et al., 2008), cachorro vinagre, *Spheotos venaticus* (FIGUEIREDO et al., 2008; JUSI et al., 2011; SOUZA et al., 2010) e lobo

guará, *Chysocyon brachyurus*, que já foram encontrados infectados (CURI et al., 2006, 2012; JUSI et al., 2011; LUPPI et al., 2008). Algumas espécies de marsupiais, *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*, também já foram encontradas naturalmente infectadas (CORREDOR et al., 1989; TRAVI, 1998). Entretanto o potencial de transmissão de *Leishmania infantum* por espécies selvagens necessitam ser elucidados. No ambiente urbano e periurbano o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório de *Leishmania infantum*, desempenhando uma função importante no perfil epidemiológico da LV (DE SOUZA SILVA & WINCK, 2018; FALQUETO et al., 1986; MARCONDES & ROSSI, 2013; TEIXEIRA-NETO et al., 2014).

Originalmente reconhecida como uma endemia rural, passou a partir da década de 1980 a demonstrar expansão geográfica e processo de urbanização devido a modificações ambientais causadas pelo homem, alterando o seu perfil epidemiológico e se tornando comum em áreas urbanas e periurbanas, auxiliando na dispersão do agente etiológico nesses ambientes (BRASIL, 2010; GONTIJO & MELO, 2004; HARHAY et al., 2011; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; WERNECK, 2010).

1.4 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Possuem de 1 a 3 mm de tamanho e apresentam como características físicas o corpo frágil revestido por cerdas, sua coloração pode variar de castanho claro a escuro, possuem segmentos antenais longos, suas pernas são longas e delicadas, as asas se mantêm em formato lanceolado e aparelho bucal com probóscide que são adaptadas para picar e sugar alimento (AKHOUNDI et al., 2016; DE AGUIAR & VIEIRA, 2018; MAROLI et al., 2012).

São conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “birigui”, “flebótomo”, “frebóti”, “ligerinho” “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha” ou “provarinho” de acordo com sua distribuição geográfica e seus nomes populares se devem a suas características físicas e comportamentais (PIMENTA et al., 2012).

São insetos holometábolos, ou seja, seu desenvolvimento ocorre em quatro estágios: ovos, larvas (quatro estágios), pupas e adultos. O período de duração de cada estágio se relaciona diretamente com as condições climáticas, ambientais e

fonte alimentar (BRAZIL e BRAZIL, 2003; COSTA e SOUZA, 2018; MAROLI et al., 2012). As formas imaturas dos flebotomíneos habitam ambientes terrestres úmidos, quente, ricos em matéria orgânica em decomposição (excrementos animais e de natureza vegetal), que fornecem abrigo, nutrição e umidade as larvas e pupas. Porém, existem poucos estudos em relação ao criadouro natural, devido ao fato de ser raro encontrá-lo na natureza (AKHOUNDI et al., 2016; COSTA e SOUZA, 2018; DE AGUIAR & VIEIRA, 2018; MAROLI et al., 2012).

Os adultos são considerados criptozóarios devido ao seu corpo delgado e apresentarem alta sensibilidade às variações climáticas. Possuem hábitos crepuscular e noturnos, e de acordo com estudos realizados em cavernas, esses insetos apresentaram atividade no período diurno e noturno. Durante o período de atividade deixam seus abrigos em busca de alimento (AGUIAR et al., 1987; BRAZIL e BRAZIL, 2003; CAMPOS et al., 2017; CARVALHO, 2014 et al., GALATI et al., MEDEIROS, 2003).

Seus abrigos naturais podem ser caracterizados troncos e raízes de árvores, copas de árvores, abrigos e tocas de animais, folhagens no solo, cavernas ou fendas em rochas. Em ambientes com modificações humanas esses insetos buscam se abrigar em anexos de animais domésticos, galinheiros, pocilga, curral, e podem ser encontrados em paredes externas e internas de residências. Algumas espécies podem apresentar especificidade de abrigo sendo encontradas majoritariamente em ambiente cavernícola, como *Lutzomyia cavernícola*, ou em tocas de animais, como espécies do gênero *Brumptomyia*, definindo sua preferência alimentar, já outras espécies apresentam ampla plasticidade ambiental e de repasto sanguíneo (BRAZIL & BRAZIL, 2003; BARATA et al., 2008; COSTA & SOUZA, 2018; DE AGUIAR & VIEIRA, 2018; GALATI et al., 2003; TOLEZANO et al., 2001).

A alimentação dos machos e fêmeas possui como fonte nutritiva carboidratos, principalmente néctares e secreções de seiva. As fêmeas, no entanto, são hematófagas, necessitam de alimentação sanguínea para ovogênese. Elas deixam seus abrigos em busca de realizar o repasto sanguíneo e a escolha pela fonte alimentar pode variar em espécie específica ou se alimentarem em distintas espécies apresentando comportamento “oportunista” (BRAZIL & BRAZIL, 2003; COSTA & SOUZA, 2018; DE AGUIAR e VIEIRA, 2018; MISSAWA e COLS., 2008; PIMENTA et al., 2012).

Os flebotomíneos apresentam imensa importância médica, uma vez que são vetores de patógenos humanos como *Leishmania* spp., *Bartonella* sp. e arboviroses (COSTA e SOUZA, 2018; RANGEL e LAISON, 2009; SHERLOCK, 2003). Devido ao seu hábito alimentar hematófago, as fêmeas de flebotomíneos são infectadas pelos protozoários *Leishmania* sp. ao realizarem o repasto sanguíneo em reservatórios infectados e podem transmitir esse patógeno ao se alimentarem novamente em outro vertebrado, humano ou animal reservatório. Os flebotomíneos com hábito alimentar “oportunista” apresentam maior capacidade vetorial uma vez que se expõem a uma variedade de hospedeiros que podem estar infectados (BRASIL, 2017; BRAZIL e BRAZIL, 2003; DE AGUIAR & VIEIRA, 2018).

Atualmente existem aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos que foram descritas pelo mundo, sendo que 530 espécies ocorrem nas Américas. O Brasil possui o registro de 279 espécies e 13 espécies vetores comprovadas de participarem do ciclo da leishmaniose no país e 18 espécies são consideradas potenciais vetores de parasitos associados a LTA e LV (DE AGUIAR & VIEIRA, 2018; RANGEL et al., 2018; SHIMABUKURO et al., 2017).

Com a expansão de atividades humanas que modificam o ambiente natural dos flebotomíneos, com desmatamento, alteração do uso do solo para atividades agrícolas e pecuárias, juntamente com o avanço da urbanização e mudanças climáticas, algumas espécies de flebotomíneos atualmente apresentam graus de adaptação e comportamento antropofílico, alterando seus hábitos silvestres estabelecendo maior contato com humanos, aumentando o risco de transmissão de *Leishmania* para humanos (ANDRADE FILHO et al., 2007; GALATI, 2003; GONTIJO et al., 2002; PIMENTA et al., 2012).

A compreensão da epidemiologia das leishmanioses só pode ser desenvolvida a partir de estudos aprofundados na ecologia dos flebotomíneos. Alguns trabalhos realizados no estado de Minas Gerais, buscaram auxiliar nessa compreensão a partir de levantamentos entomológicos e de reservatórios silvestres/domésticos, em ambientes silvestre, rural e urbano, bem como a identificação de infecção de *Leishmania* e fonte alimentar. (ANDRADE, 2012; MARGONARI, 2010; PEREIRA, 2015; QUARESMA, 2012; SILVA, 2019; TEIXEIRA NETO, 2014; TONELLI, 2017).

1.5 Impactos ambientais

As leishmanioses na década de 30, apresentavam o caráter totalmente restritos a ambientes silvestres e rurais próximos à área de mata, apresentando casos esporádicos, mas a partir de 1956 por meio de um estudo desenvolvido por Deane (1956) no estado do Ceará, foi possível observar aspectos de urbanização das leishmanioses (BARRIOS et al., 2019). Nas últimas décadas (desde a década de 80, principalmente), as leishmanioses vêm apresentando modificações em seu perfil epidemiológico, sendo registrados casos em vários países, ressurgindo ou emergindo, apresentando expansão geográfica, demonstrando importância para saúde pública e prejuízos econômicos (ASHFORD, 2000; BARATA et al., 2005; MARSELLA & DE GOPEGUI, 1998; ORYAN & AKBARI, 2016; QUINTANA et al., 2020; ROSÁRIO et al., 2017).

A expansão dessas enfermidades, assim como outras doenças tropicais, está relacionada diretamente a questões ambientais e atividades antrópicas, que modificam o ambiente natural de seus vetores. As modificações no uso da terra realizadas pelo homem compreendem o desmatamento de áreas silvestres, desenvolvimento agrícola e pecuário, extração minerária, extração madeireira, construção de estradas e a expansão de ambientes urbanos muitas vezes desorganizados. Essas modificações podem acarretar a fragmentação de mata, introdução de patógenos por migração humana, poluição da terra e do ar e pobreza humana (ROSÁRIO et al., 2017; PATZ et al. 2000; PATZ et al., 2004; RODRIGUES et al., 2019).

Os flebotomíneos são insetos altamente sensíveis e influenciados por padrões climáticos como temperatura, umidade e precipitação, que por sua vez se relacionam com a distribuição, desenvolvimento e interação com o protozoário *Leishmania* (AGUIAR & VIEIRA, 2018).

As alterações ambientais influenciam o comportamento desses insetos, mostrando que algumas espécies de flebotomíneos apresentam adaptabilidade á ambientes antrópicos, apresentando diferentes graus de plasticidade ambiental (ROSÁRIO et al., 2017; RANGEL et al, 2014). Isso se deve principalmente à diminuição da biodiversidade nos habitats naturais dos flebotomíneos. Os efeitos

negativos do desmatamento, como a redução da oferta de alimentos, podem levar à migração de vetores e animais silvestres para locais urbanizados e antropizados. Portanto, novas fontes de alimentos para esses insetos podem ser animais domésticos e humanos. (PATZ et al. 2004; SCHMIDT & OSTFELD 2001).

No Brasil algumas espécies se mostraram capazes de se adaptar a condições de degradação como a *Lu. longipalpis*, espécie responsável por participar do ciclo de transmissão de leishmaniose visceral, que demonstra alto grau de adaptabilidade a ambientes antrópicos. E uma das principais espécies que participam do ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar, *Ny. whitmani*, é encontrada em abundância em áreas antropizadas e de acordo com alguns estudos outras espécies apresentam um padrão de expansão geográfica e adaptação (AGUIAR & VIEIRA, 2018; BRAZIL, 2013; DIAS et al., 2011; ROSÁRIO et al., 2017; LANA et al., 2018; SALOMON et al., 2015; SOUZA et al., 2004).

1.6 Geoprocessamento

Geoprocessamento é um conjunto de tecnologias utilizadas para coletar, processar e exibir dados com informações demográficas georreferenciadas, tornando-se uma importante ferramenta para a construção de mapas e visualização de eventos relacionados à saúde, que podem ser utilizados para planejar, avaliar, monitorar e auxiliar na vigilância epidemiológica (CHIARAVALLLOTI-NETO, 2017; NARDI, 2013; SANTOS et al., 2004).

O geoprocessamento quando aplicado à área da saúde, é utilizado como uma ferramenta de compreensão da epidemiologia no âmbito doença-saúde de populações, empregando distribuição espacial e temporal de agravos à saúde, o monitoramento do uso do solo e dados demográficos, atribuídos a dinâmica de fatores ambientais e antrópicos. (BARCELLOS & BASTOS, 1996; CHIESA et al., 2002; MAYER, 1983; RIBEIRO et al., 2014).

O Sistema de informação geográfica (SIG), consiste em sistemas computacionais empregados no geoprocessamento, com a função de capturar, armazenar, realizar o gerenciamento e análise de dados epidemiológicos, apresentando como resultado informações geográficas (BRASIL, 2006). Sua aplicação é de grande significância para as áreas de saúde pública e questões

ambientais uma vez que possibilita realizar análises espaciais complexas, sobreposição de camadas, capacidade analítica e integração de dados de fonte diversas, como a leitura de dados pré-tabelados em *softwares* como o Excel (BRASIL, 2006; CÂMARA, DAVIS & MONTEIRO, 2001; SANTOS et al., 2004).

A análise espacial vem se tornando uma ferramenta importante para compreensão de doenças, especialmente doenças parasitárias, auxiliando na compreensão de padrões espaciais de morbidade e mortalidade relacionados a fatores de risco e no monitoramento do avanço e dinâmica das enfermidades (MEDRONHO, 2005).

Nos estudos das leishmanioses, a técnica de geoprocessamento vem sendo amplamente utilizada para avaliação de fatores como: ecologia de vetores, modelagem de nicho ecológico, distribuição e dinâmica de vetores relacionados ao uso do solo, caracterização de áreas de incidência, relação ambiental de casos humanos e caninos, interferências humanas e modificações ambientais e as expansões das leishmanioses em âmbito municipal, estadual ou nacional (ARAUJO, et al., 2013; BARBOSA, et al., 2014; BRUHN et al., 2018; CARDOSO et al., 2019; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; DEANE & DEANE, 1962; GONÇALVES et al., 2020; MACHADO DA SILVA et al., 2011; MACHADO et al., 2020; MACHADO-COELHO et al., 1999; MARCHI et al., 2019; MARGONARI, et al., 2006; MELCHIOR et al., 2017; MESTRE & FONTES, 2007; OLIVEIRA et al., 2001; PINHEIRO et al., 2019; PRADO et al., 2009; SARAIVA, et al., 2011; SILVA et al., 2021; TOLEDO et al., 2017; URSINE et al., 2021; WERNECK et al., 2002).

A criação de mapas temáticos é uma ferramenta de extrema eficácia que permite indentificar áreas prioritárias com atualizações contanstantes de dados, auxiliando no monitoramento e planejamento de ações de prevenção e controle de doenças para órgãos de saúde, reduzindo custos da vigilância em saúde (BARCELLOS & RAMALHO, 2002; BRASIL, 2006; CARVALHO & SOUZA-SANTOS, 2005; MARQUES, 2017; RODRIGUES et al., 2018).

1.7 Município de Pains, Minas Gerais

O município de Pains localizado na macrorregião Oeste de Minas Gerais e microrregião de formiga, possui uma área territorial de 421,862 Km² com cerca de

8.296 habitantes e localiza-se em uma região cárstica, que possui diversas cavidades naturais com importância arqueológica e grande interesse econômico (IBGE, 2020). A economia se estrutura em três principais setores: pecuária, agricultura e mineração. E sua distribuição de terra está subdividida em 4 principais meios: Matas, Lavouras, Silvicultura e Pastagem. Sendo 21.516 ha distribuídos para uso de pecuária e agricultura, representando cerca de 51% do território do município (IBGE, 2020; MASTER GAIA, 2015).

De acordo com o Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas, o estado de Minas Gerais é detentor de 45.76% das cavidades naturais registradas no Brasil e o principal município, com maior registro de cavidades naturais, é o município de Pains com 1.584 cavernas registradas (CANIE, 2020), possuindo grande importância espeleológica nacional e um amplo patrimônio cultural, uma vez que muitas dessas cavidades naturais serviram como abrigo para os nossos antepassados e animais pré-históricos. Mas, infelizmente, esse patrimônio cultural vem sofrendo degradações decorrentes das atividades mineradoras, que acabam interferindo nesse ecótopo e, até mesmo, destruindo algumas cavidades que ainda não foram registradas e nem tiveram um levantamento faunístico (CECAV, 2020; TEXEIRAS & DIAS, 2003).

As riquezas naturais presente no município de Pains foram ressaltadas em uma carta enviada ao governador Benedito Valadares datada em 1943, prevendo seu potencial econômico:

“a maior riqueza mineral de Pains é representada por um volume incalculável de pedreiras as quais quando industrializadas poderão fornecer cal e cimento para todo o Estado (...) possui ainda (...) grandes jazidas de mármore de variegadas cores. (...) Nas exuberantes matas de Pains abundam variedades botânicas (...) desde o gigante jequitibá até as mais raras orquídeas. Entre as madeiras de lei enumeramos: balsamo, violeta, peroba rosa, aroeira, jacarandá, ipê roxo, cedro e outros mais.” (MASTER GAIA, 2015)

Originalmente, até o ano de 1970, Pains concentrava suas fontes de renda nas atividades de agricultura e pecuária. Atualmente o poder econômico do município é dominado pela indústria do setor de mineração, sendo considerado um dos principais polos minerários do Brasil (Sumário Mineral, 2015), que possui como

finalidade a produção de cal, cimento e corretivo de solo, sendo a fonte empregatícia de 40% da população de Pains (CAMPELLO, 20--; DE CASTRO SANGUINETTO et al., 2018; LUZ & LINS, 2008; TIMO, 2014). Agricultura no município é predominante com as extensas áreas de plantações de eucalipto, que possuem como finalidade, a produção de carvão mineral e a produção de energia em fornos de indústrias da região (MASTER GAIA, 2015).

Essas atividades econômicas têm grande impacto ambiental e podem gerar perdas na biodiversidade local. O processo de desmatamento causado por esses impactos ambientais exerce uma pressão na adaptação dos insetos e conseqüentemente na urbanização dos mesmos, incluindo os flebotomíneos, o que pode acarretar na transmissão de doenças para população, tais como as leishmanioses (DEANE & DEANE, 1955; CONFALONIERI et al., 2014; MARZOCHI et al., 1985).

1.8 Leishmanioses no município de Pains, Minas Gerais

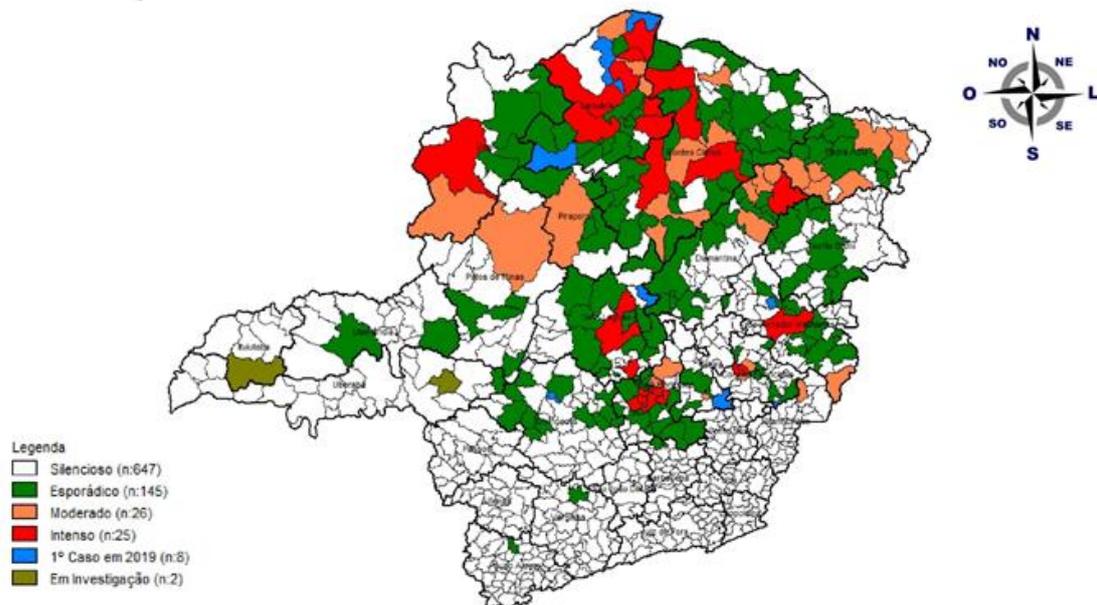
As leishmanioses vêm apresentando uma expansão geográfica no Brasil e em Minas Gerais. A região Centro-Oeste de Minas Gerais nos últimos anos apresentou um aumento nas notificações para casos de leishmanioses tegumentar e visceral, sendo que todos os municípios litrófes á Pains no período de 2001 a 2019, ao todo notificaram 57 casos de LTA e 23 casos de LV (DATASUS, 2019).

Estudos entomológicos e inquéritos sorológicos caninos realizados nos municípios de Divinópolis, Iguatama, Cláudio e Formiga, registraram a presença de vetores de *Leishmania* naturalmente infectados para LV e LTA em área urbana; e cães sororreagentes para *Le. Infantum*, parasito responsável pela leishmaniose visceral, ressaltando o estudo entomológico na área urbana de Pains que registrou espécies vetores de flebotomíneos infectados naturalmente com *Leishmania*, evidenciando uma importante competência para dispersão das leishmanioses em toda região (FARIA, 2017; LAMOUNIER, 2017; LAMOUNIER, 2020; MENEZES, 2015; NASCIMENTO, 2013; SILVA, 2019; TEIXEIRA NETO, 2014;).

O município de Pains é considerado região de transmissão esporádica de leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral (Figura 3). No período de 2002 a 2019 foram registrados pela secretaria de saúde do município 24 casos

humanos de LTA e cinco casos humanos de LV, sendo que dois casos de LV evoluíram para óbito (BRASIL, 2017; DATASUS, 2020; IBGE, 2020).

Figura 3: Classificação de Áreas de Transmissão da Leishmaniose Visceral no Estado de Minas Gerais – 2020.



Fonte: Marcelo Bueno, 2020.

Estudos vêm sendo desenvolvidos no município pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, com o objetivo de elucidar o papel epidemiológicos das leishmanioses e ecologia dos vetores na região. No ano de 2016 foi realizada uma investigação sorológica em cães presentes na área urbana de Pains, com o objetivo de verificar presença do protozoário através dos exames de DPP (Dual Path Platform) e Elisa; dos 114 cães analisados, foi verificada positividade de 9% nos cães para presença de *Leishmania* (Dados não publicados), sendo importante ressaltar que o município não possui um centro de zoonoses para controle de animais errantes.

Foram desenvolvidos também dois estudos entomológicos no município para conhecimento da fauna de flebotomíneos na área urbana e cavidades naturais. Campos et al. (2016) realizou um estudo em área externa e interna de cinco cavernas do município de Pains, com objetivo de investigar o período de atividades

dos flebotomíneos nesse ambiente. Foi observado que esses insetos em ambiente afótico apresentaram atividade no período diurno e noturno e foram registradas espécies vetores de *Leishmania* em abundância como *Lutzomyia longipalpis* e *Migonemyia migonei* com 15% e 2,7% dos exemplares totais capturados, demonstrando risco de exposição de vertebrados que visitam ou moram nesse ecótopo em ambos os períodos.

Posteriormente, no período de maio de 2015 a abril de 2018, foi realizada uma investigação entomológica com o objetivo de estudar aspectos epidemiológicos das leishmanioses na área urbana de Pains. Foram coletados 2.728 indivíduos distribuídos em 20 espécies, dentre elas, algumas incriminadas na transmissão de *Leishmania*, como: *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*. Nesse trabalho *Lutzomyia longipalpis*, principal espécie vetor de *Leishmania infantum*, agente causador da leishmaniose visceral, foi a espécie mais abundante. Na técnica de biologia molecular foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* em nove exemplares de seis espécies. Foi verificado também a fonte alimentar em 249 espécimes, e observado um regime alimentar em diferentes espécies de vertebrados domésticos e silvestres (SILVA, 2019).

Margonari et al. (2020) realizou um estudo com a população do município com objetivo de atestar o nível de conhecimento do público sobre as leishmanioses. Foram entrevistados 396 indivíduos de diferentes sexos, idade e escolaridade e, como resultado, nenhum dos entrevistados conseguiu responder corretamente a todas as perguntas sobre conhecimento básico da doença. Demonstraram conhecimentos fragmentados, e quando analisados o sexo e escolaridade, foi possível observar que as mulheres e indivíduos com maior grau de escolaridade, apresentavam maior conhecimento sobre a doença. Fato importante observado foi que todos os entrevistados declararam conviver com ao menos um fator de risco, mas apenas 52% tomavam medidas de prevenção de criadouros. Essa falta de informação somada a fatores de riscos, pode estar favorecendo a disseminação das leishmanioses.

Todos os estudos realizados demonstraram a presença de perfis epidemiológicos adequados à transmissão das leishmanioses; esses dados somados aos impactos ambientais recorrentes no município e ao crescente aumento de casos na região oeste evidenciam uma possível expansão das leishmanioses.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos o crescente aumento de notificações das leishmanioses no mundo vem sendo relacionado a ações antrópicas que modificam o ambiente natural dos flebotomíneos conduzindo assim, uma adaptação dos vetores aos ambientes antrópicos; como resultado, os seres humanos se tornam mais expostos a esses vetores e parasitos, ampliando o perfil epidemiológico complexo dessas doenças no País.

De acordo com essas circunstâncias pesquisas sobre o padrão de transmissão das leishmanioses, em diferentes níveis de antropização, são indispensáveis e necessárias para o conhecimento ecoepidemiológicos da doença, auxiliando na prevenção e controle da transmissão na área de estudo e áreas com características ambientais similares.

O município de Pains/MG possui vegetação nativa bastante fragmentada devido à pressão antrópica que ocorre na região. Essa fragmentação pode influenciar na distribuição, composição, riqueza e abundância das espécies de flebotomíneos, visto que seus habitat naturais estão sendo destruídos e, com isso, esses insetos podem usar os corredores ecológicos presente na região e alcançar as áreas próximas à cidade.

Pains é considerado pelo Ministério da Saúde como área de transmissão esporádica de leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana (média de casos nos últimos cinco anos foi maior que zero e inferior a 2,4 casos), apresentando no período de 2002 a 2019 notificados 24 casos autóctones de LTA e cinco casos de LV, sendo dois evoluídos para óbito (Tabela 1).

Tabela 1: Número de casos registrados e notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral no município Pains, Minas Gerais, no período de 2001 a 2019.

Doença	Ano de notificação												Total
	2002	2003	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2012	2013	2018	2019	
Leishmaniose Tegumentar Americana	1	3	1	5	1	1	6	4	1	-	-	1	24
Leishmaniose Visceral	-	-	1	-	-	-	-	-	2	1	1	-	5

Fonte: Ministério da saúde/SVS_DATASUS (2020) e Secretaria Municipal de Saúde de Pains (2019)

Embora existam trabalhos isolados no município de Pains realizados pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses do Instituto René Rachou/IRR com investigação entomológica na área urbana e cavernícola (CAMPOS, 2017; SILVA, 2019), pesquisa de soropositividade canina (dados não publicados) e inquérito do conhecimento da população frente às leishmanioses (MARGONARI et al., 2020); até então não existe um estudo que incorpore todo o município para o conhecimento sobre os flebotomíneos em diferentes ambientes e sua dinâmica.

Portanto é necessário o desenvolvimento de um estudo abrangente sobre esses insetos, com novas formas de avaliação do ponto de vista ecológico, tais como, analisar a distribuição dos flebotomíneos e os possíveis fatores que influenciam a disseminação/urbanização desses insetos; identificar presença de vetores e das espécies de *Leishmania* circulante, para que seja possível uma avaliação dos pontos fragilizados e pouco eficientes dentro das medidas de controle e prevenção adotadas.

Os conhecimentos adquiridos nesse estudo servirão para análise e direcionamento de propostas de medidas de controle mais efetivas e integrativas que poderão ser reproduzidas como modelo de estudo ecoepidemiológico para outras áreas com impactos ambientais semelhantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Relacionar dados entomológicos, epidemiológicos e geográficos a fim de compreender a dinâmica dos flebotomíneos em vários ambientes que compõem o município de Pains, Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

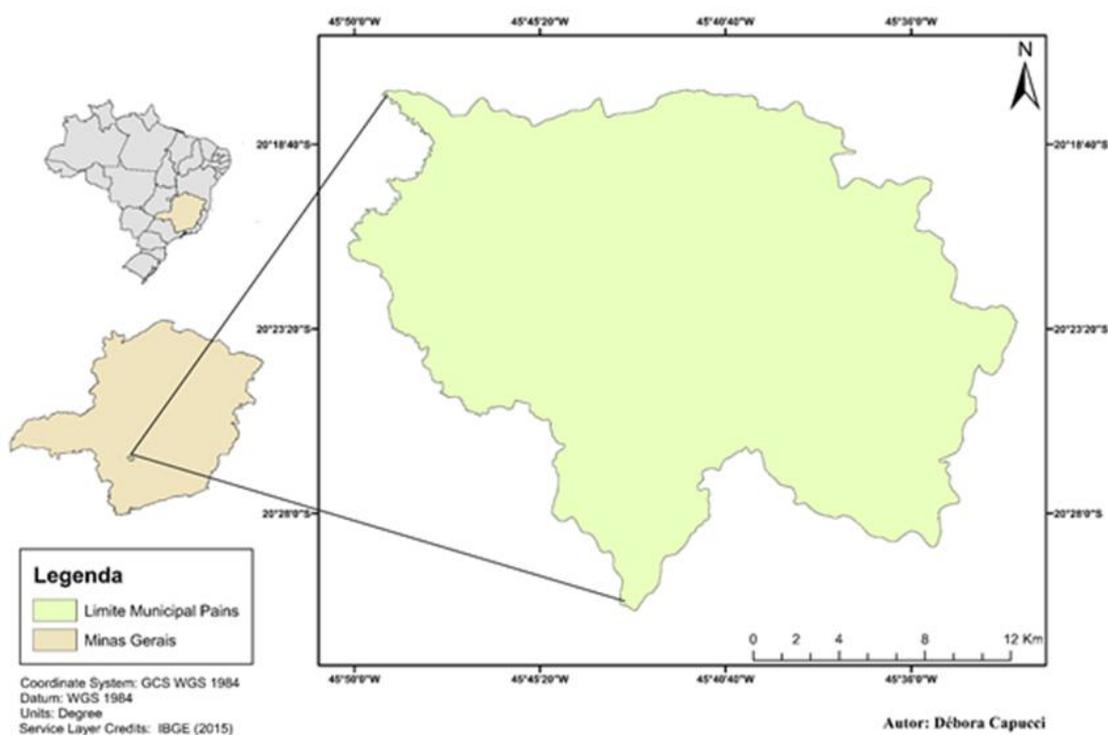
1. Identificar a fauna de flebotomíneos no município de Pains;
2. Conhecer e comparar a fauna de flebotomíneos em diferentes ambientes;
3. Comparar a ocorrência de flebotomíneos nos diferentes ecótopos quanto a riqueza, abundância, diversidade, equitabilidade e similaridade;
4. Verificar a presença de DNA de *Leishmania* nos exemplares capturados nos diferentes ambientes;
5. Analisar a fauna de flebotomíneos frente aos mapas de uso e cobertura do solo.

4. METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O Município de Pains está localizado na região Oeste de Minas Gerais, integrado à Microrregião de Formiga (Figura 4), situado a 230 km da capital Belo Horizonte em Minas Gerais, com as seguintes coordenadas geográficas: 20° 22' 13" de latitude sul e 49° 38' 26" de longitude oeste, estando limitado pelos municípios de Formiga, Arcos, Pimenta, Piumhi, Doresópolis, Iguatama e Córrego Fundo (IBGE, 2017).

Figura 4: Localização do município de Pains, Minas Gerais.



Fonte: Elaborado pela autora.

A vegetação natural do município de Pains consiste em vegetação de Cerrado e Floresta Estacional Decidual, conhecida popularmente como “Mata de Pains” que ocorre em afloramentos de calcários. De acordo com a classificação de Köppen-Geiger, o clima da região de Pains corresponde ao tipo Cwa, clima tropical com verão quente e úmido e inverno seco (IBGE, 2017; MATER, 2015; SANTOS, 2002).

O município possui uma população estimada de 8.296 habitantes (IBGE, 2020) e extensão territorial de 421,862 Km², localizado em região cárstica, sua área territorial apresenta grande interesse econômico para empresas de mineração de calcário. As rochas carbonáticas são utilizadas para produção de cal, cimento e corretivos agrícolas, representando um dos maiores polos minerários de cal em Minas Gerais. Além disso seus índices econômicos são baseados também na indústria agrícola e pecuária leiteira (IBGE, 2017; IBRAM, 2015).

4.2 Delineamento do estudo

4.2.1 Estudo entomológico

As coletas entomológicas foram realizadas sob a licença número 15237-2 (Anexo 1), mensalmente durante duas noites consecutivas, no período de agosto de 2018 a julho de 2019. Para a captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas automáticas CDC, modelo HP (PUGEDO et al. 2005), que possui uma luz artificial para atrativo dos flebotomíneos e um motor (1,5 volts) que mantém o sistema de exaustão de ar direcionado para o saco/tubo coletor, nestes estudo este foi substituído por tubo Falcon (50 ml) com álcool etílico 70% e 10% de glicerina. As armadilhas foram colocadas antes do pôr do sol e recuperadas duas noites posteriores na parte da manhã.

Os flebotomíneos foram coletados em sete ecótopos do município de Pains/MG, que foram selecionados conforme as características paisagísticas, vegetação natural ou plantada e grau de antropização (Figura 5) (Quadro 1), com o auxílio de 30 (trinta) armadilhas luminosas (Figura 6) que foram instaladas e distribuídas em pontos de coleta específicos de cada paisagem, de acordo com o seguinte plano:

- **Zona Urbana:**

Três domicílios com uma armadilha disposta em cada. Os domicílios foram escolhidos de acordo com estudo de Silva (2019) onde foram capturados uma grande quantidade de flebotomíneos e exemplares infectados naturalmente, nos anos de 2015 e 2016.

- **Ambiente de Fazenda:**

Duas fazendas com ambientes de pastagem com presença de gado e porcos

- Fazenda 1 com três armadilhas dispostas
- Fazenda 2 com uma armadilha disposta

- **Ambiente de mata nativa:**

Três ambientes de mata nativa

- Mata 1 com três armadilhas dispostas
- Mata 2 e mata 3 com uma armadilha disposta em cada

- **Ambiente de caverna:**

Caverna do Brega com três armadilhas com uma armadilha na zona de entrada, uma armadilha à 50 metros da entrada na zona de penumbra e uma armadilha a 100 metros da entrada na zona afótica.

- **Ambiente de plantação de eucalipto:**

Dois ambientes com área de plantação

- Plantação de Eucalipto 1 com uma armadilha exposta
- Plantação de Eucalipto 2 com três armadilhas expostas

- **Ambiente de mineração de calcário:**

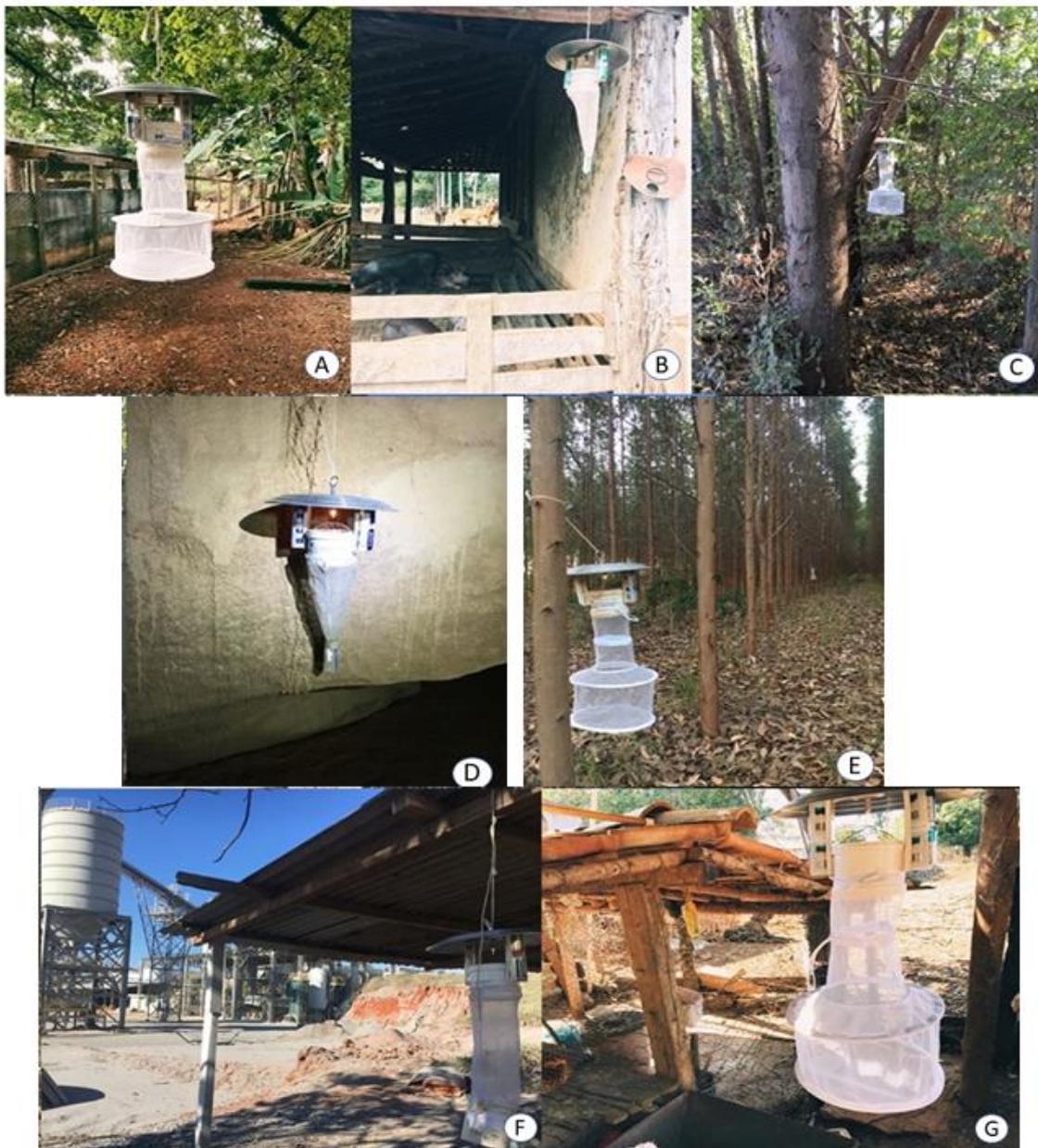
Duas empresas de mineração de calcário, sendo distribuídas três armadilhas em cada local.

- **Distrito (Zona rural):**

Dois distritos com uma armadilha disposta em cada domicílio

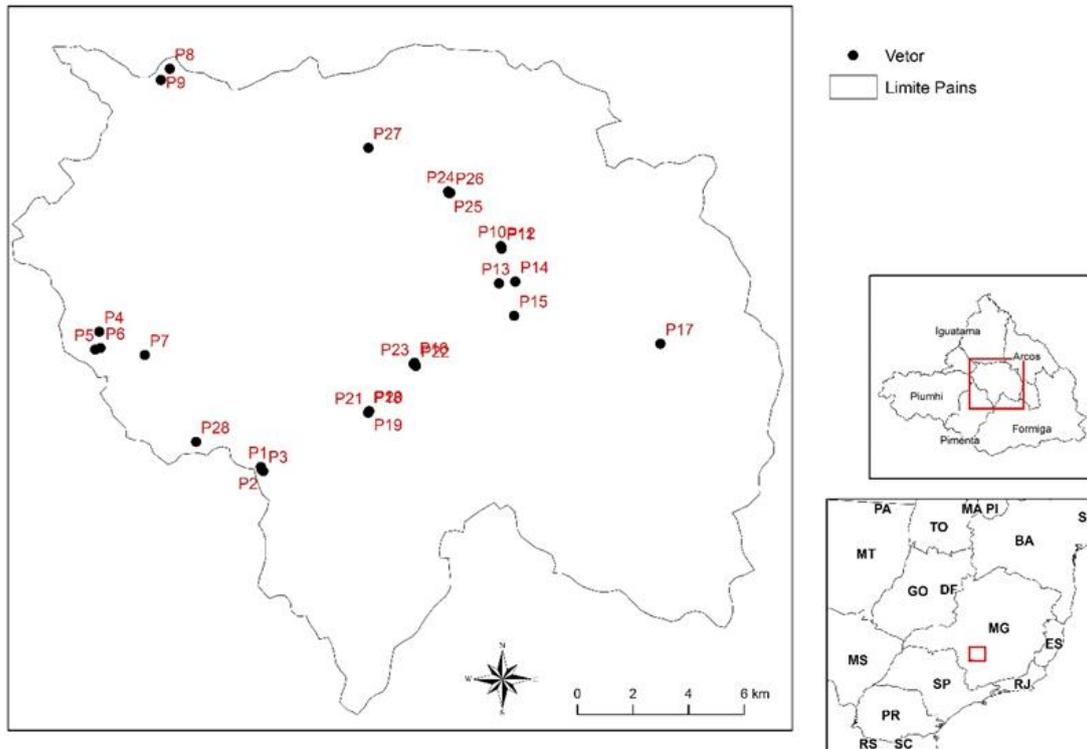
- Distrito 1 - Vila Costina com três domicílios
- Distrito 2 - Capoeirão com dois domicílios

Figura 5: Armadilhas luminosas do tipo CDC dispostas nos sete ecótipos no município de Pains, Minas Gerais. A - Armadilha disposta no ambiente de perímetro urbana em uma bananeira; B - Armadilha disposta no ambiente de fazenda próximo à porcos e cavalos; C - Armadilha disposta no ambiente de mata nativa, D – Armadilha disposta no ambiente de caverna em zona afótica; E- armadilha disposta no ambiente de plantação de eucalipto; F- armadilha disposta no ambiente de mineração próximo aos maquinários; G- armadilha disposta no ambiente de distrito próximo ao galinheiro.



Fonte: o autor

Figura 6: Distribuição das armadilhas utilizadas nas coletas no município de Pains/MG.



P1: Mata 1; P2: Mata 1; P3: Mata 1; P4: Distrito 2; P5: Distrito 2; P6: Distrito 2; P7: Mata 2; P8: Distrito 1; P9: Distrito 1; P10: Mineradora 1; P11: Mineradora 1; P12: Mineradora 1; P13: Perímetro urbano; P14: Perímetro urbano; P15: Perímetro urbano; P16: Mineradora 2; P17: Eucalipto 1; P18: Eucalipto 2; P19: Eucalipto 2; P20: Eucalipto 2; P21: Mata 3; P22: Mineradora 2; P23: Mineradora 2; P24: Fazenda 1; P25: Fazenda 1; P26: Fazenda 1; P27: Fazenda 2; P28: Caverna entrada.

Fonte: Vladimir e Debora, 2021

Quadro 1: Caracterização ambiental e localização geográfica dos pontos de coleta realizada no município de Pains/MG, no período de agosto de 2018 e julho de 2019.

Pontos	Nome oficial	Caracterização Ambiental	Latitude	Longitude
1	Mata 1	Área de vegetação nativa	20°25'35.7"	045°44'58.7"
2	Mata 1	Área de vegetação nativa, próximo a afloramentos rochosos de calcário.	20°25'39.1"	045°44'57.6"
3	Mata 1	Área de vegetação nativa, em uma depressão do solo.	20°25'40.6"	045°44'55.6"
4	Distrito 2	Residência com presença de animais de criação (Cachorros) e entulho no jardim.	20°22'55.2"	045°48'18.5"
5	Distrito 2	Residência com presença de animais de criação (Cachorros e galinhas), com diversas árvores frutíferas.	20°23'16.3"	045°48'23.6"
6	Distrito 2	Residência com presença de animais de criação (Cachorros, galinhas, gado e equinos), presença de coleção de água (pequeno lago artificial) e árvores frutíferas.	20°23'14.5"	045°48'17.1"
7	Mata 2	Área de vegetação nativa	20°23'23" S	045°47'22"
8	Distrito 1	Residência com presença de animais de criação (cachorros, gatos, galinhas) e árvores frutíferas.	20°17'45.5"	045°46'49.2 "
9	Distrito 1	Residência com presença de animais de criação (cachorros, equinos, cabras e galinhas), com entulho no jardim.	20°17'58.5"	045°47'00.5"
10	Mineradora 1	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica.	20°21'16.5"	045°39'59.7 "
11	Mineradora 1	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica.	20°21'19.6"	045°39'58.4"
12	Mineradora 1	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica.	20°21'18.1"	045°39'58.5"
13	Perímetro Urbano	Residência com vegetação nativa e de cultivo de cana, com presença de animais de criação (Cachorros, galinhas e gatos).	20°22'00.4"	045°40'02.0"
14	Perímetro Urbano	Residência com presença de diversos tipos de árvores frutíferas e animais de criação (Cachorro e galinhas).	20°21'58.3"	045°39'41.7"
15	Perímetro Urbano	Lote vago formado por grande afloramento rochosos de calcário e árvores, com presença de animais de criação (Cachorro e galinhas).	20°22'38.6"	045°39'43.3"
16	Mineradora 2	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica. Armadilha disposta em uma árvore.	20°23'33.5"	045°41'47.2"

Pontos	Nome oficial	Caracterização Ambiental	Latitude	Longitude
17	Eucalipto 1	Área de plantação de eucalipto, ambiente homogêneo serapilheira.	20°23'12.3"	045°36'41.9"
18	Eucalipto 2	Área de plantação de eucalipto, ambiente homogêneo serapilheira.	20°24'31.4"	045°42'44.7"
19	Eucalipto 2	Área de plantação de eucalipto, ambiente homogêneo serapilheira.	20°24'31.1"	045°42'44.2"
20	Eucalipto 2	Área de plantação de eucalipto, ambiente homogêneo serapilheira.	20°24'32.2"	045°42'42.6"
21	Mata 3	Área de vegetação nativa localizada ao lado da plantação de eucalipto.	20°24'31.5"	045°42'42.0"
22	Mineradora 2	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica. Armadilha disposta em uma árvore	20°24'31.1"	045°42'41.4"
23	Mineradora 2	Empresa de mineração de calcário, ambiente seco com névoas de pó de cal, com ausência de matéria orgânica. Armadilha disposta no alojamento dos funcionários ao lado do maquinário.	20°24'32.9"	045°42'43.0"
24	Fazenda 1	Fazenda com criação de animais (cachorros, galinhas, gado e porcos), com grande área de pastagem e lago com criação de peixes. Armadilha disposta perto da sede, próximo ao riacho e árvores frutíferas.	20°20'11.7"	045°41'04.6"
25	Fazenda 1	Fazenda com criação de animais (cachorros, galinhas, gado e porcos), com grande área de pastagem e lago com criação de peixes. Armadilha disposta dentro da pocilga e ao lado e um galinheiro.	20°20'13.44"	045°41'3.61"
26	Fazenda 1	Fazenda com criação de animais (cachorros, galinhas, gado e porcos), com grande área de pastagem e lago com criação de peixes. Armadilha disposta no curral.	20°20'13.2"	045°41'02.0"
27	Fazenda 2	Fazenda com criação de animais (cachorros, galinhas, gado e porcos), com grande área de pastagem.	20°19'19.8"	045°42'43.3"
28	Caverna Entrada	Ambiente cavernícola, úmido, com presença de vestígios de animais. Armadilha disposta na zona de entrada com luz abundante e próxima a vegetação nativa.	20°25'05.7"	045°46'18.9"
29	Caverna Interior 1	Ambiente cavernícola, úmido, com presença de vestígios de animais. Armadilha disposta na zona de penumbra localizada à 50 metros da entrada.	-	-
30	Caverna interior 2	Ambiente cavernícola, úmido, com presença de vestígios de animais. Armadilha disposta na zona afótica localizada à 100 metros da entrada.	-	-

Obs: Os pontos 29 e 30 correspondentes a localização das armadilhas dispostas dentro da caverna, não foram georreferenciados devido à falta de sinal de satélite.

Fonte: Elaborado pela autora.

As armadilhas foram identificadas no campo, por ambiente, para determinar posteriormente: à distribuição das espécies e localização dos espécimes que positivos para presença de DNA de *Leishmania*.

As análises faunísticas dos flebotomíneos foram divididas da seguinte forma:

- **Para as análises da fauna de flebotomíneos presentes no estudo e para o estudo do georreferenciamento e sistema geográfico de informação (SIG)**, foram utilizadas todas as 30 (trinta) armadilhas dispostas no estudo.
- **Para as análises ecológicas da fauna de flebotomíneos nos diferentes ambientes e estatísticas**, foram utilizadas as armadilhas dos ambientes que apresentavam o total de três armadilhas, sendo os seguintes pontos escolhidos:
 - Zona urbana: pontos 13, 14 e 15;
 - Distrito Vila Costina: pontos 4, 5 e 6;
 - Fazenda 1: pontos 24, 25 e 26;
 - Plantação de Eucalipto: pontos 18,19 e 20;
 - Mineração: pontos 10,11 e 12;
 - Mata Nativa: pontos 1, 2 e 3;
 - Caverna: pontos 28, 29 e 30.

4.2.2 Processamento dos flebotomíneos coletados

O material entomológico, capturado mensalmente, após o recolhimento das armadilhas foi acondicionado em temperatura ambiente em tubos tipo Falcon de 50 ml contendo com álcool etílico 70% e 10% de glicerina, que foram devidamente rotulados com identificação dos locais de coleta e levados ao laboratório do Grupo de Estudos em Leishmanioses do Instituto René Rachou/IRR. Primeiramente foi realizada a triagem, onde foram separados os flebotomíneos de outros insetos e lavagem do álcool glicerinado em uma placa de Petri com álcool 70%. Logo em seguida, os machos e fêmeas foram acondicionados em tubos do tipo eppendorf contendo álcool 70% em temperatura ambiente para posterior montagem e identificação taxonômica.

4.2.3 Preparação, montagem e identificação dos flebotomíneos

Para montagem dos exemplares machos capturados, foram utilizadas técnicas modificadas do protocolo descrito por Langeron (1949). Primeiramente, os exemplares passaram por um processo de clarificação, sendo transferidos para placas de Petri (identificadas de acordo com os pontos de coleta) e submersos em solução de Fenol durante 12 horas, posteriormente foram transferidos para placas contendo solução de Hidróxido de potássio (KOH 10%) durante 2 horas para amolecimento da quitina. Após esse período, estes foram transferidos para outras placas de petri com solução de ácido acético 10% para uma lavagem rápida, para se retirar o excesso de potassa; em seguida os insetos foram submetidos a duas séries de lavagem em álcool (álcool 70% por 15 minutos e álcool absoluto por 15 minutos). Após esses procedimentos, os flebotomíneos foram mantidos em um recipiente com Eugenol por pelo menos 24 horas para o processo de diafanização. Os machos foram montados em vista lateral com Bálsamo do Canadá, e identificados com auxílio de microscópio óptico.

As fêmeas foram dissecadas utilizando agulha de insulina estéril, retirando-se a cabeça e os três últimos segmentos abdominais para montagem em meio líquido de Berlese em posição ventral, permitindo a visualização das estruturas internas para identificação taxonômicas, e o restante do corpo do inseto foi armazenado individualmente a seco em tubos de 1,5ml estéril, devidamente identificados (pontos, data de captura, fêmeas alimentadas ou não alimentadas) e mantidos em freezer a -20 °C para posteriores análises moleculares.

As fêmeas alimentadas, que apresentavam vestígio de sangue em seu abdômen foram separadas; estas foram acondicionadas em solução Dimetilsulfóxido (DMSO 6%), que possui ação de preservação das células, evitando a deterioração celular, e posteriormente, foram armazenadas em temperatura ambiente para posterior dissecação, identificação taxonômica e análise molecular.

A identificação taxonômica de ambos os sexos foi feita através de observação de caracteres morfológicos com auxílio da chave taxonômica de Galati (2018) e comparações com exemplares que foram depositados na Coleção de Flebotomíneos

(COLFLEB) do Instituto René Rachou. As abreviações dos gêneros estão de acordo com Marcondes (2007).

4.3 Métodos moleculares para Identificação de *Leishmania* sp.

4.3.1 Extração do DNA das fêmeas não alimentadas

Após a identificação das espécies por análise microscópica, as fêmeas não ingurgitadas foram processadas individualmente para detecção de infecção por *Leishmania* spp. através da técnica de PCR. Para realizar a extração do DNA dos flebotomíneos foi utilizado o kit *Gentra Puregene Tissue Kit* (Qiagen, EUA) seguindo protocolo adaptado das instruções do fabricante, conforme descritos a seguir:

Inicialmente as fêmeas foram maceradas individualmente em tubos do tipo *ependorf* com auxílio de pistilos estéreis em 100 µL de solução de lise celular, após a trituração do inseto foi adicionado 1µL de proteinase K e feita a inversão dos tubos para se realizar a mistura dos componentes, estes foram incubados “overnight” a 55°C. Na manhã do dia seguinte foi adicionado 1µL de RNase e misturado por inversão, logo após as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e em seguida, incubadas no gelo por 10 minutos.

Após incubação foi adicionado 100µL de solução de precipitação de proteínas, agitados pelo vortex e centrifugados por 5 min a 14.000rpm para formação do pellet de proteína. Em tubos de *ependorf* estéreis foi adicionado 300 µL de isopropanol juntamente com o sobrenadante do passo anterior. Foi misturado 50 vezes por inversão e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os tubos foram colocados invertidos em papel absorvente para secagem durante 60 min. Após a secagem foi adicionado 300 µL de álcool 70% e realizado inversão dos tubos 10 vezes para lavar o pellet de DNA. Posteriormente foram adicionados 30 µL de acetato de sódio 10% e levado ao freezer -70 °C por 60 minutos, sequencialmente as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e descartado o sobrenadante.

Na etapa de secagem, os tubos foram colocados invertidos no papel absorvente em um período “overnight” para secagem total do DNA. No último passo do protocolo, foram adicionados 30 µL de solução de hidratação de DNA e

incubadas em temperatura ambiente durante 8 horas para posteriormente serem armazenadas no freezer -20 °C.

4.3.2 PCR dirigida ao alvo Internal Transcribed Spacer (ITS1)

Para determinar a presença de DNA de *Leishmania* nos flebotomíneos capturados, após a extração de DNA as amostras individuais foram direcionadas para técnica de PCR dirigida ao *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1) do DNA ribossomal de *Leishmania*, utilizando o kit GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega). A técnica amplifica um fragmento de 300-350 pares de base (pb) da região intergênica do DNA de *Leishmania*, utilizando os seguintes pares de iniciadores: LITSR: 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S: 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' (SCHONIAN et al, 2003).

A reação foi preparada para o volume final de volume final de 25µL contendo 5 µL de DNA da amostra, 5 µL da solução tampão 5x, 1,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de dNTP mix (10mM), 0,8 µL do iniciador LITSR (10uM), 0,8 µl do iniciador L5.8S (10uM), 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL), 1,25 µL de DMSO e 10 µL de H₂O destilada estéril.

Posteriormente, a reação foi processada nos equipamentos termocicladores automáticos (Eppendorf® Mastercycler Gradient e Veriti™ 96-Well Thermal Cycler) para amplificação da região intergênica, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 72°C por dez minutos e o resfriamento a 4 °C.

Em todas as reações de PCR realizadas foi utilizado como controle positivo, DNA extraído da cepa referência MHOM/BR/75/M4147 da espécie *Leishmania guyanensis*, e um controle negativo utilizando 20 µL referente ao mix do PCR e 5 µL de água destilada estéril.

Para visualização dos resultados provenientes da amplificação das amostras, foi empregado a técnica de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% corado com brometo de etídio e peso molecular de tamanho padrão 100 pb (DNA Step Ladder), em exposição à luz ultravioleta (UV). As amostras classificadas como

positivas são as que apresentaram banda de peso molecular correspondente ao esperado, 300-350pb.

4.3.3 Identificação da Espécie de *Leishmania* por PCR RFLP

As amostras amplificadas (PCR-ITS1) classificadas positivas foram submetidas à técnica de PCR-RFLP para a identificação das espécies de *Leishmania*, no qual o produto amplificado foi submetido a digestão da enzima de restrição *HaeIII*, através da técnica de RFLP. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15µL, contendo 10,0µL de produto de PCR, 2,8 µL de H₂O destilada, 1,5 µL de tampão da enzima, 0,2 de BSA e 0,5µL de *HaeIII* (10U/µL). A reação foi incubada por duas horas a 37°C, e os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% e os padrões foram comparados com os produtos de PCR das cepas de referência de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Le. guyanensis*, para confirmação e identificação das espécies.

4.4 Dados climáticos

Os dados climáticos de Temperatura média (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm³), referentes ao período de estudo foram obtidos junto ao do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados foram provenientes da Estação Meteorológica de superfície automática da estação de Bambuí (A565), Minas Gerais.

4.5 Geoprocessamento

4.5.1 Caracterização do uso e ocupação do solo no município de Pains

A imagem no formato TIFF que foi utilizada para a criação do mapa de caracterização do uso e cobertura do solo no município de Pains foi adquirido gratuitamente no banco de imagens de satélite da DGI/INPE, pertencente ao satélite CBERS, referente ao ano 2019.

O processamento e classificação da imagem foi realizado no software ArcGis 10.8 com a extensão ArcGIS *Spatial Analyst*, utilizando a ferramenta “classificação de imagens supervisionada”, utilizando as bandas red, blue e green com extração gerando um conjunto de amostras para o treinamento do classificador de Máxima

verossimilhança que realizou a divisão das classes com amostras uniformes. De acordo com VALE et al., (2018) Máxima verossimilhança (MAXVER) é um classificador caracterizado por um tipo "pixel a pixel", pois usa apenas informações espectrais separadas de cada pixel para encontrar áreas uniformes. O algoritmo utiliza parâmetros estatísticos para considerar o peso da distância entre os valores médios dos níveis numéricos da classe.

Foram definidas sete classes diferentes de uso e ocupação do solo para o município de Pains, sendo elas: mata nativa, cultivo, urbano, campo, distrito e mineração. Após a classificação, a imagem foi exportada em formato shapefile e foi realizada uma investigação minuciosa dos polígonos gerados referente a cada classe, editando os polígonos não classificados e editando aqueles polígonos que foram confundidos com outras classes, para que houvesse uma classificação fiel e verdadeira dos polígonos a sua classe.

4.5.2 Análise espacial – Mapas temáticos

Para realização da análise espacial e criação de mapas temáticos utilizou-se as informações dos flebotomíneos coletados no presente estudo, o mapa de uso e classificação do solo e as localizações de mineradoras no município.

As localizações geográficas dos pontos de coleta foram obtidas com auxílio de equipamento para registro de posicionamento global GPS *Garmin GPSMap 64x*, sendo realizada uma marcação por armadilha disposta e inseridos no *Google Earth* (Google ©), posteriormente o arquivo KML foi convertido para *shapefile* para composição no mapa. E o dado referente aos limites do município foi adquirido através do site do IBGE, no formato *shapefile*.

Para criação dos mapas os dados foram relacionados, processados e analisados no software ArcGis.

4.5.3 Análise Fauna Flebotomínea

Para análise de atributos ecológicos, foi utilizado o número total de indivíduos coletados, para os cálculos de abundância e riqueza. Foram obtidos os valores de

constância de ocorrência das espécies baseado no índice ecológico proposto por Dajoz (1983) determinada pela fórmula:

$$C = (P \times 100) / N$$

No qual, C é o valor da constância da espécie, P é o número de coletas contendo a espécie e N o número total de coletas efetuadas. De acordo com os percentuais obtidos, as espécies foram separadas nas seguintes categorias: espécies constantes que estão presentes em mais de 50,0% das coletas; espécies acessórias presentes em 25,0% a 50,0% das coletas e espécies acidentais presentes em menos de 25,0% das coletas (DAJOZ, 1983).

4.6 Análise estatística

Os dados coletados em ambientes que apresentavam três armadilhas foram usados para análises estatísticas. A diversidade alfa ou diversidade local e a equitabilidade da comunidade de flebotomíneos nos ambientes foi determinada pelo Índice de Diversidade de Shannon (H'), baseado na riqueza e abundância das espécies de flebotomíneos, e de Índice de Equitabilidade de Pielou (J), baseado na abundância de cada espécie nos diferentes ambientes amostrados.

A similaridade da ocorrência e abundância relativa das espécies de flebotomíneos entre os diferentes ambientes do estudo foi determinada pelo Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) por meio de uma matriz de dissimilaridade calculada segundo o índice de Bray-Curtis (dados de abundância relativa das espécies) e de Jaccard (dados de ocorrência das espécies). A PERMANOVA não paramétrico (Análise Multivariada de Permutação) com 999 repetições nas matrizes de distâncias (ANDERSON, 2001) foi usada para testar a existência de similaridade nas comunidades de flebotomíneos entre os diferentes ambientes amostrados (ambiente de caverna, mata nativa, plantação de eucalipto, ambiente de mineração, fazenda, distritos e perímetro urbano).

Para as análises de diversidade, NMDS e PERMANOVA não paramétrico foram considerados apenas os ambientes que foram amostrados por meio de três armadilhas. As análises estatísticas foram realizadas considerando o somatório dos dados referentes às três armadilhas colocadas em cada ambiente de coleta. Todas

as análises estatísticas foram realizadas por meio dos pacotes Vegan e BAT (CARDOSO et al. 2015) no *software* R 3.6.1 (R *Development Core Team* 2016).

5. RESULTADOS

5.1 Composição da fauna de flebotomíneos

No período de agosto de 2018 a Julho de 2019 foram coletados e identificados 1.352 espécimes de flebotomíneos no município de Pains, pertencentes a 10 gêneros (*Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Expapillata*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia*, *Sciopemyia*) com 24 espécies registradas, sendo elas: *Brumptomyia brumpti* (Larousse, 1920), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942), *Brumptomyia pinto* (Costa Lima, 1932), *Evandromyia cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia teratodes* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Evandromyia walkeri* (Newstead, 1914), *Expapillata firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Sciopemyia microps* (Mangabeira, 1942), *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) (Tabela 2).

Tabela 2: Espécies de flebotomíneos e número de machos e fêmeas coletados com armadilha do tipo CDC, modelo HP, nos 30 pontos de coleta no município de Pains/Minas Gerais no período de agosto de 2018 a julho de 2019.

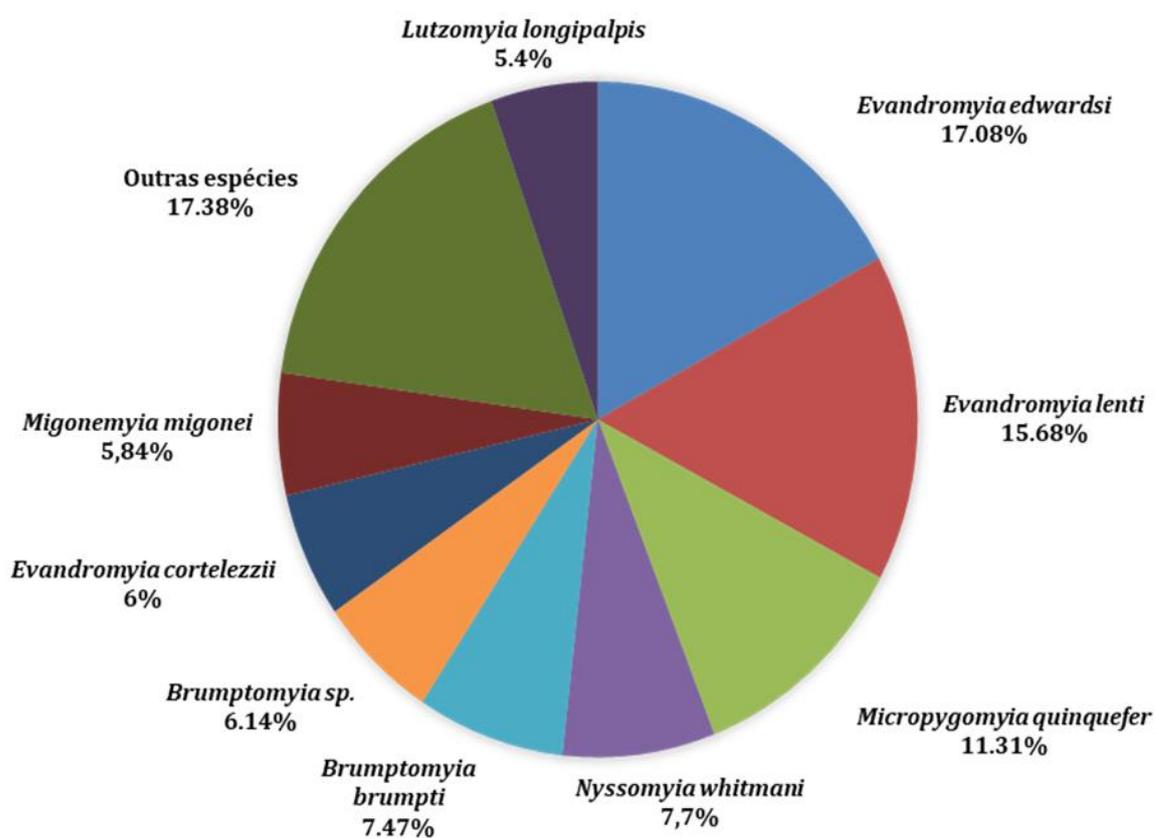
Flebotomíneos	Nº de flebotomíneos capturados				Total (%)
	♀	%	♂	%	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	1	0.99	100	99.01	101 (7.47)
<i>Brumptomyia cunhai</i>	-	-	10	100	10 (0.74)
<i>Brumptomyia pintoii</i>	-	-	4	100	4 (0.30)
<i>Brumptomyia</i> sp.	83	100	-	-	83 (6.14)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	60	74.07	21	25.93	81 (6.00)
<i>Evandromyia edwardsi</i>	127	54.98	104	45.02	231 (17.08)
<i>Evandromyia lenti</i>	99	46.70	113	53.30	212 (15.68)
<i>Evandromyia teratodes</i>	1	100	-	-	1 (0.07)
<i>Evandromyia termitophila</i>	12	92.30	1	7.70	13 (0.96)
<i>Evandromyia walkeri</i>	1	25	3	75	4 (0.30)
<i>Expapillata firmatoi</i>	1	16.67	5	83.33	6 (0.44)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	10	13.70	63	86.30	73 (5.40)
<i>Lutzomyia renei</i>	-	-	2	100	2 (0.15)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	65	42.49	88	57.51	153 (11.31)
<i>Migonemyia migonei</i>	44	55.70	35	44.30	79 (5.84)
<i>Nyssomyia neivai</i>	14	38.39	22	61.11	36 (2.67)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	81	77.89	23	22.11	104 (7.70)
<i>Pintomyia fischeri</i>	1	50	1	50	1 (0.14)
<i>Pintomyia christenseni</i>	3	100	-	-	3 (0.22)
<i>Pintomyia monticola</i>	20	86.95	3	13.05	23 (1.70)
<i>Pintomyia pessoai</i>	25	52.08	23	47.92	48 (3.55)
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	1	11.11	8	88.89	9 (0.67)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	16	66.67	8	33.33	24 (1.78)
<i>Sciopemyia microps</i>	-	-	1	100	1 (0.07)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	36	73.47	13	26.53	49 (3.62)
Total	701	51.85	651	48.15	1352 (100)

Fonte: Elaborado pela autora

Os gêneros mais abundantes do estudo foram *Evandromyia* (40,08%) representada por seis espécies coletadas, *Brumptomyia* (14,64%) com três espécies, *Micropygomyia* (11,31%) com uma espécie e *Nyssomyia* (10,35%) com duas espécies. O gênero *Evandromyia* também o que compreendeu o maior número de espécies quando comparado com os demais gêneros registrados.

As espécies mais abundantes foram respectivamente, *Evandromyia edwardsi* (17,08%), *Evandromyia lenti* (15,68%), *Micropygomyia quinquefer* (11,31%) e *Nyssomyia whitmani* (7,7%) e *Brumptomyia brumpti* (7,47%) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Porcentagem das espécies de flebotomíneos coletados nos sete ecótopos no município de Pains/Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019.



Fonte: Elaborado pela autora

Foram capturadas 701 fêmeas (51.85%) e 651 machos (48.15%), sendo a razão fêmea/macho igual a 1.07/1.0. Em relação as fêmeas coletadas no estudo, 661 foram submetidas à detecção de *Leishmania* sp. e e 40 fêmeas que apresentavam sinais de alimentação sanguínea recente, foram destinadas a estudos de fonte alimentar (dados não apresentados).

Os resultados apresentados na tabela 3 representam o total de espécies de flebotomíneos em cada ponto de coleta. Sendo os pontos: ponto 28 (134 espécimes), 1 (125 espécimes) e o ponto 27 (123 espécimes), os que apresentam maior abundância, localizados em caverna, mata e fazenda respectivamente. Em contrapartida os pontos 16 (três espécimes) e 10 (quatro espécimes) foram os que apresentam menor abundância, sendo ambos localizados no ecótopo de mineração.

Ao analisar a distribuição das espécies por ponto, nenhuma das 24 espécies foram registradas em todos os 30 pontos de coleta. As espécies *Ev. cortelezzii*, *Sc. sordellii*, tiveram registro em 21 dos pontos de coleta, já *Ny. whitmani* em 20 pontos, *Br. brumpti* e *Ev. lenti* foram registradas em 19 e 18 pontos de coletas, respectivamente.

Tabela 3: Total de flebotomíneos coletados no município de Pains/MG no período de agosto de 2018 a julho de 2019, segundo os pontos de coleta.

Flebotomíneos	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	Total
<i>Br. brumpti</i>	41	3	2	1	-	-	8	1	1	-	1	-	-	1	-	1	-	12	6	5	8	1	1	2	1	2	-	3	-	-	101
<i>Br. cunhai</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	1	-	10
<i>Br. pinto</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Br. sp.</i>	24	1	4	-	-	2	11	3	2	1	1	-	1	-	2	-	1	6	5	5	3	-	-	3	1	1	-	4	2	-	83
<i>Ev. cortelezzii</i>	2	3	1	3	11	6	1	5	9	-	4	1	4	-	13	-	-	2	-	1	-	2	5	-	4	2	1	1	-	81	
<i>Ev. edwardsi</i>	2	10	4	-	-	1	-	-	-	-	4	-	-	3	34	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	62	90	18	231
<i>Ev. lenti</i>	2	1	3	13	2	2	4	7	5	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-	22	63	81	1	-	212	
<i>Ev. teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ev. termitophila</i>	1	3	1	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	13
<i>Ev. walkeri</i>	-	-	-	-	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Ex. firmatoi</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Lu. longipalpis</i>	-	-	22	-	5	-	-	-	1	1	1	1	23	1	-	-	1	-	-	-	2	-	-	3	7	5	-	-	-	-	73
<i>Lu. renei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2
<i>Mi. quinquefer</i>	4	29	24	1	-	-	-	1	7	-	5	-	2	1	19	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	5	-	43	5	4	153
<i>Mg. migonei</i>	5	3	1	-	-	-	1	-	4	-	1	-	2	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	6	11	4	17	11	3	4	79
<i>Ny. neivai</i>	-	-	-	-	1	1	1	5	16	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4	1	2	-	-	1	36
<i>Ny. whitmani</i>	5	17	3	-	2	-	2	5	7	-	2	1	7	1	3	-	-	-	-	1	1	-	-	18	7	6	12	1	3	-	104
<i>Pi. fisheri</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Pi. christenseni</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Pi. monticola</i>	11	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	23
<i>Pi. pessoai</i>	8	4	5	-	1	-	8	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	4	2	-	-	-	-	1	8	1	4	-	-	-	48
<i>Pa. aragoi</i>	2	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	9
<i>Pa. lutziana</i>	12	-	1	-	-	-	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	24
<i>Sc. microps</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Sc. sordellii</i>	1	4	6	2	-	4	1	2	1	1	1	-	1	-	-	-	-	1	2	4	4	-	-	1	1	-	3	4	4	1	49
Total Geral	125	80	86	21	24	17	41	30	57	4	22	5	41	13	78	3	6	30	18	25	21	5	8	35	69	93	123	134	110	28	1352

Fonte: Elaborado pela autora

A tabela 4 demonstra a distribuição das espécies de acordo com os meses de coleta. Sendo os dados correspondentes ao somatório de todas as armadilhas dispostas no município de Pains.

O maior número de flebotomíneos coletados por mês foi de 218 (16.13%) em fevereiro/2019, seguido por 217 (16.05%) em outubro/2018, 204 (15.09%) em janeiro/2019, 192 (14.2%) em novembro/2018, 139 (10.28%) em dezembro/2018; e os demais meses representaram 28.25% de abundância dos espécimes coletados. No mês com maior abundância (fevereiro/2019), *Evandromyia lenti* foi responsável pelo pico mensal, representando 45.87% das espécies capturadas.

As espécies *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia edwardsi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani*, foram coletadas em todos os meses do estudo. As espécies *Evandromyia teratodes* e *Sciopemyia microps* foram registradas apenas em uma das coletas realizadas, no mês de abril e março respectivamente. As demais espécies foram registradas em pelo menos dois meses.

Tabela 4: Distribuição mensal dos flebotomíneos coletados em Pains/MG no período de agosto de 2018 a 2019.

Flebotomíneos	ago/18	set/18	out/18	nov/18	dez/18	jan/19	fev/19	mar/19	abr/19	mai/19	jun/19	jul/19	Total
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2	14	58	4	1	10	8	-	2	1	1	-	101
<i>Brumptomyia cunhai</i>	-	1	6	1	1	-	-	-	-	1	-	-	10
<i>Brumptomyia pintoii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	1	4
<i>Brumptomyia sp.</i>	3	9	30	7	5	9	3	5	2	4	5	1	83
<i>Evandromyia cortelezii</i>	6	5	10	6	8	10	11	9	2	1	6	7	81
<i>Evandromyia edwardsi</i>	16	16	30	63	32	23	19	8	5	3	6	10	231
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	10	9	5	49	100	28	7	1	2	-	212
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Evandromyia termitophila</i>	-	-	1	3	1	4	3	-	-	1	-	-	13
<i>Evandromyia walkeri</i>	-	-	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	4
<i>Exapillata firmatoi</i>	-	-	-	1	5	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3	6	2	1	21	1	6	8	1	4	8	12	73
<i>Lutzomyia renei</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	-	-	11	46	28	35	18	4	5	4	1	1	153
<i>Migonemyia migonei</i>	1	1	7	16	6	14	11	4	7	8	-	4	79
<i>Nyssomyia neivai</i>	-	-	2	8	5	11	7	1	1	-	1	-	36
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	1	14	10	2	4	6	6	5	23	18	11	104
<i>Pintomyia fisheri</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Pintomyia christenseni</i>	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	3
<i>Pintomyia monticola</i>	-	-	4	3	6	8	-	1	1	-	-	-	23
<i>Pintomyia pessoai</i>	-	1	8	7	7	10	11	1	1	2	-	-	48
<i>Psathyromyia aragoi</i>	-	-	2	-	1	-	3	1	-	1	-	1	9
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	2	9	2	3	1	1	-	1	1	-	2	24
<i>Sciopemyia microps</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Sciopemyia Sordellii</i>	-	-	13	4	1	12	8	5	4	-	2	-	49
Total Geral (%)	38 (2.81)	56 (4.14)	217 (16.05)	192 (14.2)	139 (10.28)	204 (15.09)	218 (16.13)	84 (6.21)	46 (3.4)	58 (4.29)	50 (3.7)	50 (3.7)	1352

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com os valores de frequência de constância das 24 espécies capturadas, 15 foram consideradas constantes, quatro acessórias e cinco acidentais (Tabela 5).

Tabela 5: Total de flebotomíneos coletados e índice de constância de espécies encontradas em Pains/MG

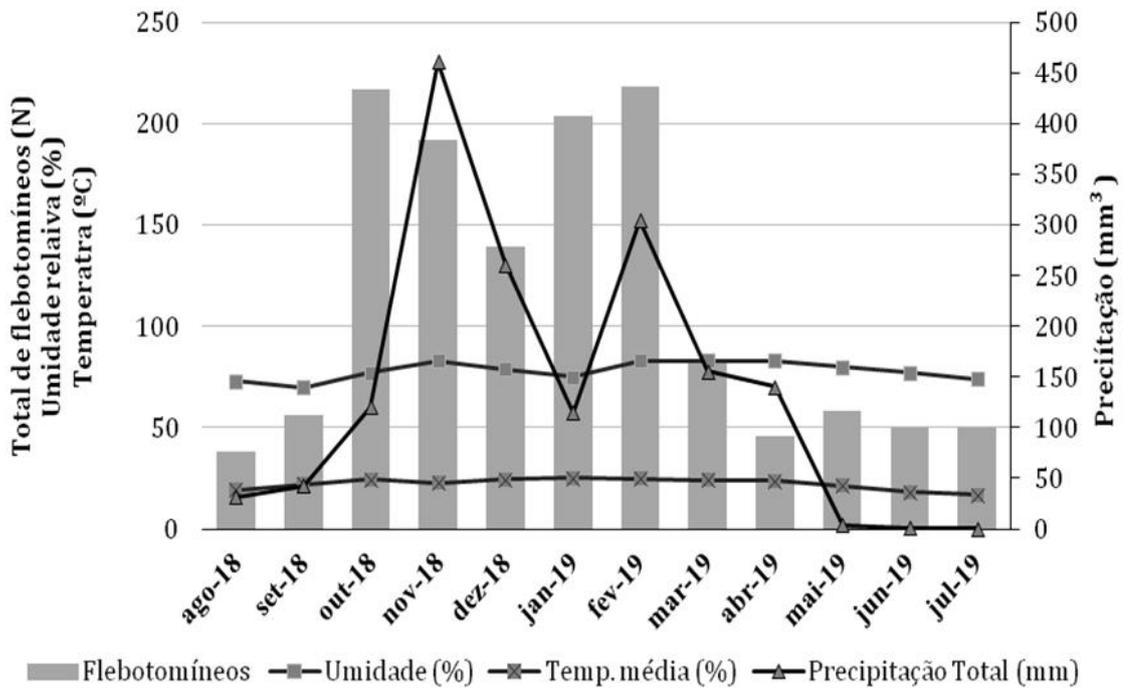
Espécies	Total (n)	C	
		%	Classificação
<i>Brumptomyia brumpti</i>	101	83,33	Constante
<i>Brumptomyia cunhai</i>	10	41,66	Acessória
<i>Brumptomyia pintoii</i>	4	25	Acessória
<i>Brumptomyia sp.</i>	83	100	Constante
<i>Evandromyia cortelezii</i>	81	100	Constante
<i>Evandromyia edwardsi</i>	231	100	Constante
<i>Evandromyia lenti</i>	212	83,33	Constante
<i>Evandromyia teratodes</i>	1	8,33	Acidental
<i>Evandromyia termitophila</i>	13	50	Constante
<i>Evandromyia walkeri</i>	4	25	Acessória
<i>Expapillata firmatoi</i>	6	16,66	Acidental
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	73	100	Constante
<i>Lutzomyia renei</i>	2	16,66	Acidental
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	153	83,33	Constante
<i>Migonemyia migonei</i>	79	91,66	Constante
<i>Nyssomyia neivai</i>	36	66,66	Constante
<i>Nyssomyia whitmani</i>	104	100	Constante
<i>Pintomyia christenseni</i>	3	25	Acessória
<i>Pintomyia fischeri</i>	2	16,66	Acidental
<i>Pintomyia monticola</i>	23	50	Constante
<i>Pintomyia pessoai</i>	48	75	Constante
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	9	50	Constante
<i>Psathyromyia lutziana</i>	24	83,33	Constante
<i>Sciopemyia microps</i>	1	8,33	Acidental
<i>Sciopemyia sordellii</i>	49	66,66	Constante

C: Constância de espécies; Constante: Espécies presentes em 50% ou mais das capturas; Acessórias: encontradas em 25-50% das capturas; Acidentais: presentes em menos de 25% das capturas.

Fonte: Elaborado pela autora

Em relação aos parâmetros climáticos, as temperaturas médias durante o período do estudo variaram entre 16,75 °C a 25,2 °C. A umidade relativa do ar apresentou pouca variação, permanecendo entre 70% e 83%. Já os valores mensais de precipitação pluviométrica variaram entre 0,6mm³ registrada no mês de julho e 460,8mm³ no mês de novembro (Gráfico 2). O teste U de Mann Whitney e Person não apresentaram correlação entre a distribuição de flebotomíneos e as variáveis climáticas.

Gráfico 2: Relação de parâmetro climáticos na abundância das espécies de flebotomíneos coletadas no período de agosto de 2018 a julho de 2019 em Pains, Minas Gerais.



Fonte: Elaborado pela autora

5.2 Fauna flebotomínica coletada nos diferentes ecótopos: Mata, plantação de eucalipto, urbano, distrito, mineração, fazenda e caverna.

A fauna entre os sete ecótopos foi analisada a partir dos ambientes com três armadilhas próximas, sendo selecionados 21 pontos dos 30 pontos de coleta do estudo presente. Foram coletados 1.083 flebotomíneos pertencentes a 24 espécies: *Brumptomyia brumpti* (Larousse, 1920), *Brumptomyia cunhai* (Mangabeira, 1942), *Brumptomyia pinto* (Costa Lima, 1932), *Evandromyia cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia teratodes* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Evandromyia walkeri* (Newstead, 1914), *Expapillata firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psathyromyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Sciopemyia microps* (Mangabeira, 1942), *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) (Tabela 6).

Tabela 6: Abundância de espécies de flebotomíneos distribuídas nos ambientes de caverna, distrito, plantação de eucalipto, fazenda, mata, mineradora e perímetro urbana no município de Pains/MG, durante o período de agosto de 2018 a julho de 2019.

Flebotomíneos	Ecótopos						Total Geral (%)	
	Caverna	Distrito	Eucalipto	Fazenda	Mata	Mineradora		Perímetro Urbano
<i>Brumptomyia brumpti</i>	3	2	23	5	46	1	1	81 (7.48)
<i>Brumptomyia cunhai</i>	3	-	-	2	4	-	-	9 (0.83)
<i>Brumptomyia pintoii</i>	-	-	3	-	-	-	-	3 (0.28)
<i>Brumptomyia sp.</i>	6	5	16	5	29	2	3	66 (6.1)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	1	14	3	6	6	5	17	52 (4.8)
<i>Evandromyia edwardsi</i>	170	-	1	2	16	4	37	230 (21.24)
<i>Evandromyia lenti</i>	1	12	1	85	6	2	-	107 (9.88)
<i>Evandromyia teratodes</i>	-	-	1	-	-	-	-	1 (0.09)
<i>Evandromyia termitophila</i>	-	-	1	1	5	-	-	7 (0.64)
<i>Evandromyia walkeri</i>	-	1	-	-	-	-	-	1 (0.09)
<i>Exapillata firmatoi</i>	-	-	-	-	1	1	4	6 (0.55)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	1	-	15	22	3	24	65 (6.0)
<i>Lutzomyia renei</i>	1	-	-	-	-	-	1	2 (0.18)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	52	8	-	6	57	5	22	150 (13.85)
<i>Migonemyia migonei</i>	18	4	-	21	9	1	8	61 (5.63)
<i>Nyssomyia neivai</i>	1	21	-	5	-	1	2	30 (2.77)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	12	1	31	25	3	11	87 (8.03)
<i>Pintomyia fischeri</i>	-	-	1	-	1	-	-	2 (0.18)
<i>Pintomyia christenseni</i>	-	-	2	-	1	-	-	3 (0.28)
<i>Pintomyia monticola</i>	1	-	1	-	19	-	1	22 (2.65)
<i>Pintomyia pessoai</i>	-	-	6	10	17	1	-	34 (3.14)
<i>Psathyromyia aragaii</i>	1	-	3	-	3	-	-	7 (0.64)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	-	4	3	1	13	-	-	21 (1.94)
<i>Sciopemyia microps</i>	1	-	-	-	-	-	-	1 (0.09)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	9	3	7	2	11	2	1	35 (3.23)
N.º de indivíduos	272	87	73	197	291	31	132	1083
% de indivíduos	25.11	8.03	6.74	18.20	26.87	2.86	12.19	100
Riqueza	14	11	15	14	18	12	12	24

Fonte: Elaborado pela autora.

As espécies mais abundantes foram *Evandromyia edwardsi* (230), *Micropygomyia quinquefer* (150), *Evandromyia lenti* (107), *Nyssomyia whitmani* (87) e *Brumptomyia brumpti* (81), somando 655 espécimes (60,48%).

No ambiente de mata nativa foi observado a maior abundância e riqueza, apresentando 291 espécimes (26.87%) e 18 espécies. As espécies mais abundantes desse ambiente foram *Micropygomyia quinquefer* com 57 espécimes (19.59%) e *Brumptomyia brumpti* com 46 espécimes (15.80%). O segundo e terceiro ecotópos com maior abundância foram o ambiente de caverna que registrou 272 espécimes (25.11%), sendo as espécies mais abundantes, *Evandromyia edwardsi* com 170 flebotomíneos (62.5%) e *Micropygomyia quinquefer* com 52 flebotomíneos (19.11%); o ambiente de fazenda compreendeu 197 espécimes (18.20%), tendo como espécies mais abundantes *Evandromyia lenti* com 85 exemplares (43.15%) e *Nyssomyia whitmani* com 31 exemplares (15.73%).

O segundo ambiente que apresentou maior riqueza foi o ambiente de plantação de eucalipto com 15 espécies e 73 espécimes (6.47%). A espécie mais abundante para esse ambiente foi *Brumptomyia brumpti* com 23 flebotomíneos (31.50%).

No ambiente urbano foi observado 132 espécimes (12.9%) pertencentes a 12 espécies. As espécies mais abundantes foram *Evandromyia edwardsi* com 37 flebotomíneos (29.03%) e *Lutzomyia longipalpis* com 24 flebotomíneos (18.18%). O ambiente de distrito registrou 87 espécimes (8.03%) e 11 espécies, tendo como espécies mais abundantes: *Nyssomyia neivai* com 21 exemplares (24.13%) e *Evandromyia cortelezii* com 14 exemplares (16.10%).

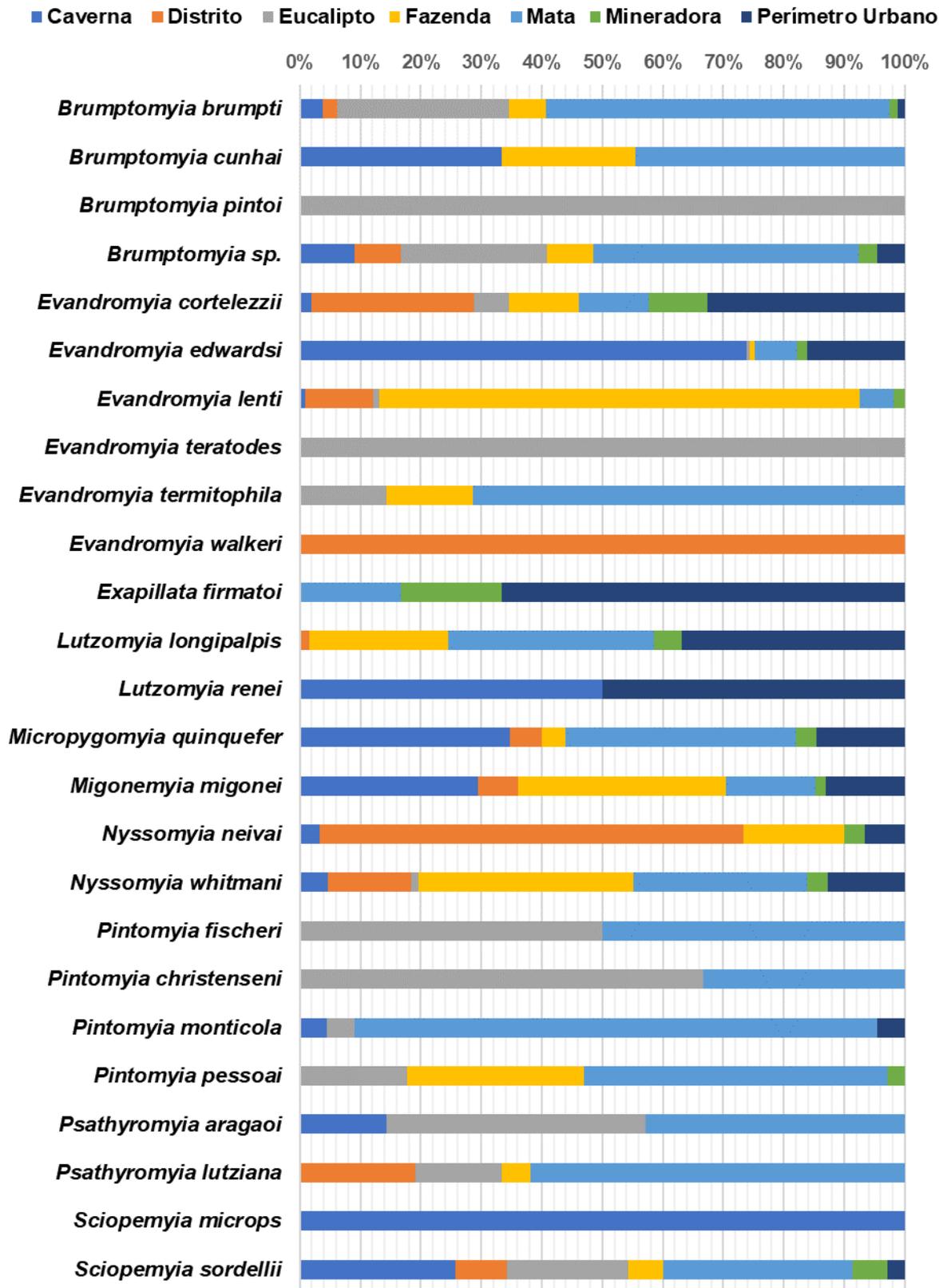
O ambiente de mineração apresentou 31 espécimes (2.86%) e 12 espécies. As espécies mais abundantes foram *Evandromyia cortelezii* e *Micropygomyia quinquefer*, ambas com 5 exemplares (16.13%).

Foi observado espécies exclusivas de alguns ambientes, sendo elas: *Evandromyia teratodes* encontrada apenas no ambiente de plantação de eucalipto, *Evandromyia walkeri* no ambiente de distrito e *Sciopemyia microps* encontrada no ambiente cavernícola (Gráfico 3).

Os flebotomíneos *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia sp.*, *Evandromyia cortelezzii*, *Nyssomyia whitmani*, *Sciopemyia sordellii* foram encontrados em todos ambientes do estudo e algumas espécies foram encontradas em seis dos sete ambientes, sendo as espécies e os ambientes que não foram coletados respectivamente: *Evandromyia edwardsi* no ambiente de distrito, *Evandromyia lenti* no ambiente urbano, *Micropygomyia quinquefer* e *Migonemyia migonei* no ambiente de plantação de eucalipto.

Em referência às espécies vetoras comprovadas de transmissão de *Leishmania*, observou-se que o vetor *Lutzomyia longipalpis* apresentou maior densidade nos ambientes de perímetro urbano com 36.92% dos espécimes registrados e o ambiente de mata com 33.84%. Já os espécimes de *Migonemyia migonei* foram capturados predominantemente nos ambientes de Fazenda (34.42%) e caverna (29.5%), *Nyssomyia neivai* majoritariamente no ambiente de distrito (70%) e *Nyssomyia whitmani* prevalentemente nos ambientes de fazenda (35.63%) e mata (28.73%).

Gráfico 3: Ocorrência relativa das espécies de flebotomíneos no município de Pains, Minas Gerais, de acordo com a porcentagem de ocorrências em cada ecótopos do estudo



Fonte: Elaborado pela autora

No ambiente de caverna as armadilhas foram dispostas em três zonas: zona de entrada caracterizada pela presença de luz solar abundante, zona penumbra (Interior 1) com pouca luz solar e zona afótica (Interior 2) caracterizada pela ausência de luz solar.

As espécies mais abundantes foram *Evandromyia edwardsi* (62.5%) e *Micropygomyia quinquefer* (19.12%). A zona de entrada foi o local com maior abundância e riqueza, com 134 (49.26%) exemplares e 11 espécies, seguido da zona de penumbra com 110 (40.44%) exemplares distribuídos em oito espécies e a zona afótica com 28 (10.30%) flebotomíneos e cinco espécies (Tabela 7).

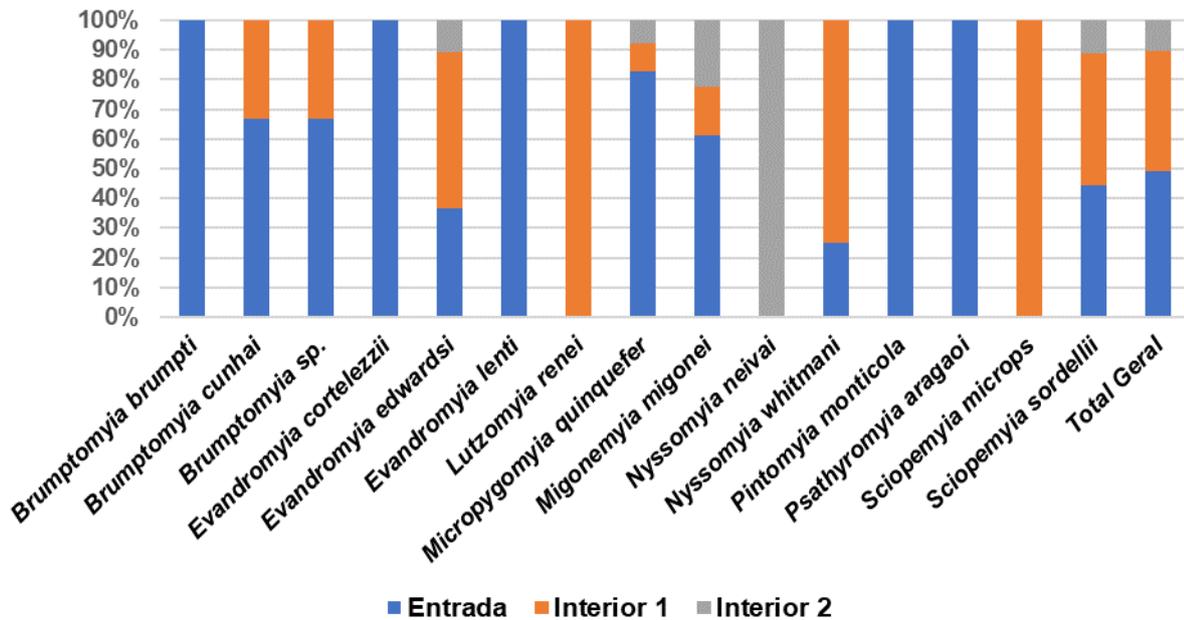
Tabela 7: Abundância de espécies de flebotomíneos distribuídas no ambiente de caverna nas zonas de entrada, penumbra (Interior 1) e afótica (Interior 2) no município de Pains/MG, durante o período de agosto de 2018 a julho de 2019

Flebotomíneos	Entrada	Interior 1	Interior 2	Total Geral
<i>Brumptomyia brumpti</i>	3	-	-	3
<i>Brumptomyia cunhai</i>	2	1	-	3
<i>Brumptomyia sp.</i>	4	2	-	6
<i>Evandromyia cortelezii</i>	1	-	-	1
<i>Evandromyia edwardsi</i>	62	90	18	170
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	-	1
<i>Lutzomyia renei</i>	-	1	-	1
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	43	5	4	52
<i>Migonemyia migonei</i>	11	3	4	18
<i>Nyssomyia neivai</i>	-	-	1	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	3	-	4
<i>Pintomyia monticola</i>	1	-	-	1
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	1	-	-	1
<i>Sciopemyia microps</i>	-	1	-	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	4	4	1	9
Total Geral	134	110	28	272

Fonte: Elaborado pela autora

Algumas espécies foram restritas a determinadas zonas da caverna, como as espécies *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia lenti*, *Pintomyia monticola*, *Psathyromyia aragaoi* que foram capturadas somente na zona de entrada, no interior 1 foram capturados exclusivamente as espécies *Sciopemyia microps*, *Lutzomyia renei* e a espécie *Nyssomyia neivai* foi registrada apenas no interior 2 (Gráfico 4).

Gráfico 4: Ocorrência relativa das espécies de flebotomíneos no ambiente de caverna, de acordo com a porcentagem de ocorrências em cada zona de distribuição das armadilhas (Entrada, Interior 1 e Interior 2).



Fonte: Elaborado pela autora

Com exceção do ambiente de caverna, a diversidade e a equitabilidade da comunidade de flebotomíneos calculada para os ambientes analisados juntamente foi semelhante a diversidade e equitabilidade registrada para cada ambiente estudado separadamente. O ambiente de caverna apresentou a menor diversidade de espécies e a menor uniformidade da distribuição dos indivíduos. Os demais ambientes apresentaram valores de diversidade bem próximos entre si e a distribuição de indivíduos entre as diferentes espécies forem bem uniformes (Tabela 8).

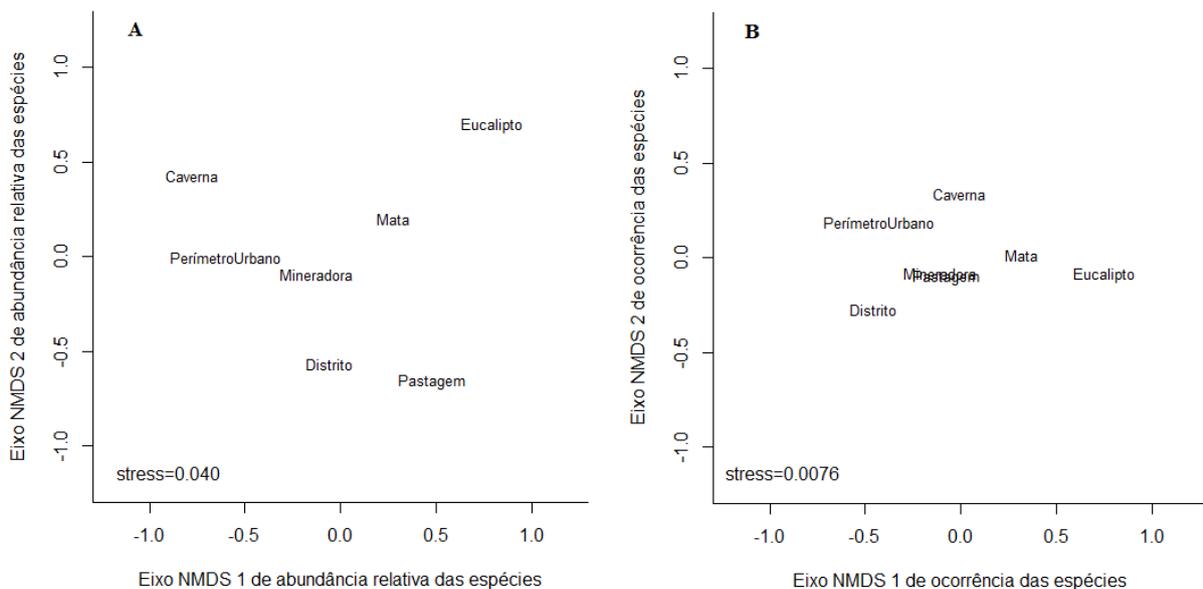
Tabela 8: Índice de diversidade Shannon-Weaver (H') e equitabilidade de Pielou (J), da fauna de flebotomíneos encontrados nos sete ambientes do estudo no município de Pains, Minas Gerais

Diversidade/Equitabilidade		
Ambientes amostrados	Índice de Shannon (H')	Índice de Pielou (J)
Ambientes	2,5665	0,7877
Caverna	1,2924	0,4772
Distrito	2,1558	0,8676
Eucalipto	2,1614	0,7796
Fazenda	1,9255	0,7110
Mata	2,5151	0,8542
Mineradora	2,3891	0,9314
Perímetro Urbano	2,0560	0,7791

Fonte: Elaborado por Aldenise Campos

O escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para os dados de abundância relativa e ocorrência das espécies de flebotomíneos coletados entre os diferentes ambientes amostrados explicaram 90% e 85% da variação dos dados, respectivamente. Não houve diferença significativa para os dados de abundância relativa e ocorrência das espécies de flebotomíneos entre os diversos ambientes estudados (PERMANOVA: $F= 0.5134$; $R^2= 0.0931$; $P= 0.8155$ e $F=0.8652$; $R^2=0.1475$; $P=0.5044$, respectivamente) (Figura 7).

Figura 7: Escalonamento multidimensional Não Métrico - NMDS usando matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e Jaccard calculada com os dados de ocorrência e abundância relativa das espécies de flebotomíneos coletados entre diversos ambientes (ambiente de caverna, mata nativa, plantação de eucalipto, ambiente de mineração, fazenda, distritos e perímetro urbano).



Fonte: Elaborado por Aldenise Campos

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

O total de 664 (94,72%) fêmeas não alimentadas referentes a coleta realizada de agosto de 2018 a julho de 2019 foram destinadas a técnica de PCR direcionada ao alvo ITS1 para pesquisa de DNA de *Leishmania* e analisadas individualmente. Um total de 47 fêmeas (7.08%) foram positivas para presença de DNA de *Leishmania* sp., sendo registradas nos flebotomíneos *Brumptomyia* sp (4.82%), *Evandromyia cortelezzii* (10%), *Evandromyia edwardsi* (7.08%), *Evandromyia lenti* (10.10%), *Lutzomyia longipalpis* (20%), *Micropygomyia quinquefer* (4.61%), *Migonemyia migonei* (4.54%), *Nyssomyia whitmani* (6.17%), *Pintomyia pessoai* (4%), *Psathyromyia lutziana* (12.5%) e *Sciopemyia sordellii* (8.33%). A taxa de positividade das amostras positivas foi de 7.08% e a taxa de positividade por espécie está listado na tabela (Tabela 9).

Tabela 9: Fêmeas de flebotomíneos analisadas por meio da técnica de PCR e taxa de infecção no município de Pains/MG no período de agosto de 2018 a julho de 2019.

Flebotomíneos	Total de fêmeas utilizadas para o estudo de detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	Positivo para PCR ITS1	Taxa de infecção (%)
<i>Brumptomyia brumpti</i>	1	-	-
<i>Brumptomyia cunhai</i>	-	-	-
<i>Brumptomyia pintoii</i>	-	-	-
<i>Brumptomyia sp.</i>	81	4	4.82
<i>Evandromyia cortelezii</i>	59	6	10
<i>Evandromyia edwardsi</i>	126	9	7.08
<i>Evandromyia lenti</i>	93	10	10.10
<i>Evandromyia teratodes</i>	1	-	-
<i>Evandromyia termitophila</i>	12	-	-
<i>Evandromyia walkeri</i>	1	-	-
<i>Expapillata firmatoi</i>	1	-	-
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	8	2	20
<i>Lutzomyia renei</i>	-	-	-
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	65	3	4.61
<i>Migonemyia migonei</i>	37	2	4.54
<i>Nyssomyia neivai</i>	14	-	-
<i>Nyssomyia whitmani</i>	69	5	6.17
<i>Pintomyia fischeri</i>	1	-	-
<i>Pintomyia christenseni</i>	3	-	-
<i>Pintomyia monticola</i>	18	-	-
<i>Pintomyia pessoai</i>	23	1	4
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	1	-	-
<i>Psathyromyia lutziana</i>	16	2	12.5
<i>Sciopemyia microps</i>	-	-	-
<i>Sciopemyia sordellii</i>	34	3	8.33
Total Geral (%)	664	47	7.08

Fonte: Elaborado pela autora

A tabela 10 representa a distribuição dos flebotomíneos positivos para presença de DNA de *Leishmania* nos sete ambientes de estudo. Todos os ambientes apresentaram flebotomíneos positivos, sendo os ambientes de caverna e fazenda os que apresentaram maior positividade. Ressalta-se a presença de flebotomíneos positivos em ambientes com alterações humanas.

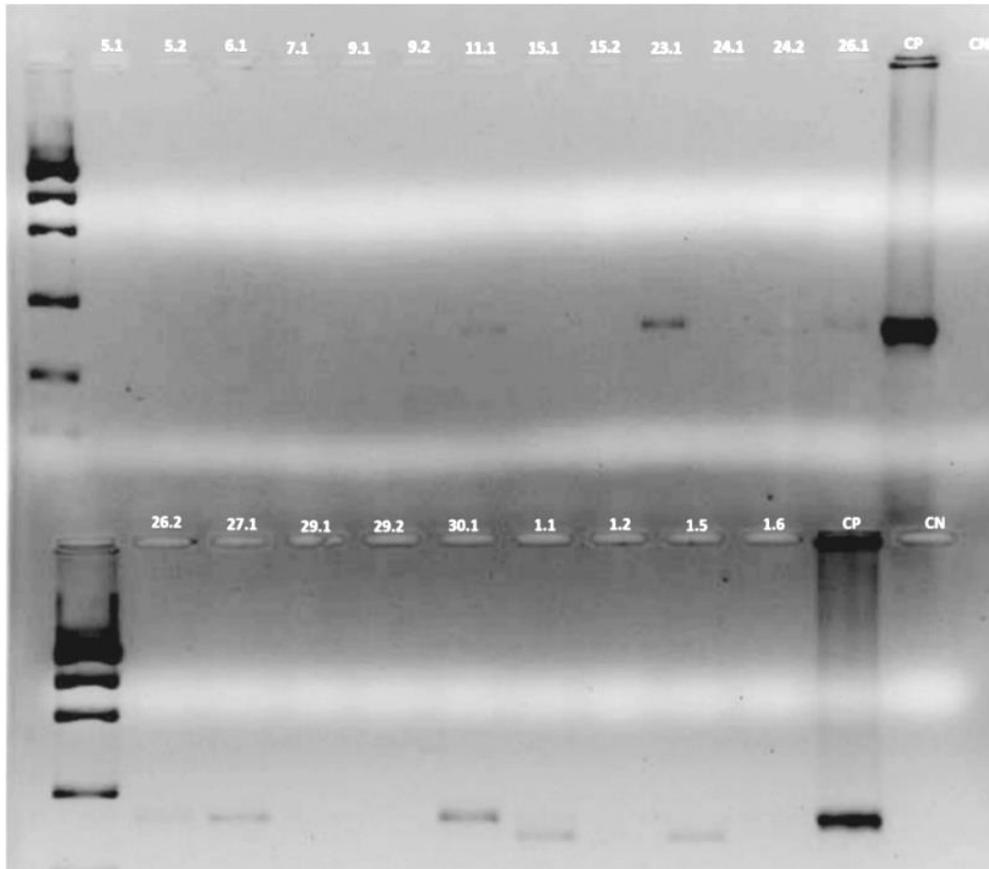
Tabela 10: Distribuição dos flebotomíneos positivos para DNA de *Leishmania* por espécie e ecótopos no município de Pains, Minas Gerais nos meses de agosto de 2018 a julho de 2019.

Fonte: Elaborado pela autora

Flebotomíneos	Distrito	Urbano	Fazenda	Mineração	Caverna	Mata	Eucalipto
<i>Evandromyia cortelezii</i>	2	1	1	1	-	-	1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	-	1	1	-	-	-
<i>Migonemyia migonei</i>	-	-	1	-	1	-	-
<i>Nyssomyia whitmani</i>	-	-	3	-	-	2	-
<i>Psathyromyia lutziana</i>	-	-	2	-	-	-	-
<i>Evandromyia edwardsi</i>	-	2	-	-	8	-	-
<i>Brumptomyia sp.</i>	-	-	-	-	1	2	1
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	-	-	-	-	2	1	-
<i>Pintomyia pessoai</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	8	1	-	-	-
<i>Sciopemyia Sordellii</i>	-	-	-	-	-	1	1
Total	3	3	17	3	12	6	3

A figura 8 representa uma amplificação do produto de PCR ITS1 referentes aos meses de agosto e setembro de fêmeas não alimentadas para identificação de presença de DNA de *Leishmania*.

Figura 8: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados da PCR ITS1 a partir das fêmeas individuais de flebotomíneos coletadas nos meses de agosto e setembro no município de Pains/MG.

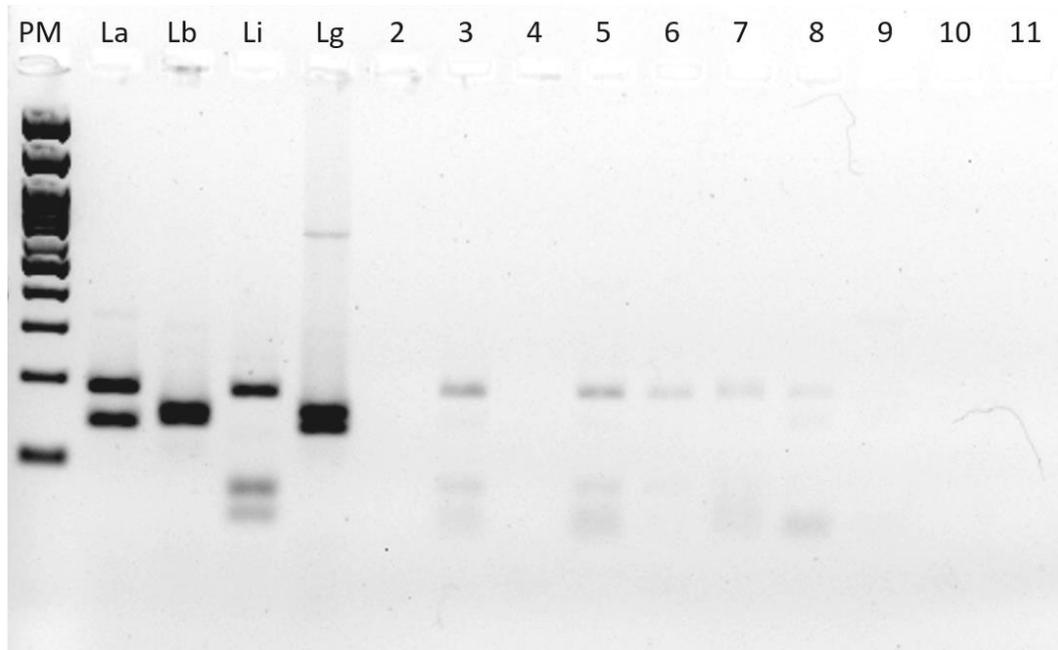


PM: Peso Molecular 100pb, 5.1: *Evandromyia cortelezzii*, 5.2: *Evandromyia cortelezzii*, 6.1: *Evandromyia cortelezzii*, 7.1: *Brumptomyia* sp., 9.1: *Psathyromyia lutziana*, 9.2: *Evandromyia lenti*, 11.1: *Lutzomyia longipalpis*, 15.1: *Evandromyia edwardsi*, 15.2: *Evandromyia edwardsi*, 15.4: *Nyssomyia whitmani*, 23.1: *Evandromyia cortelezzii*, 24.1: *Nyssomyia whitmani*, 24.2: *Brumptomyia* sp., 26.1: *Lutzomyia longipalpis*, 26.2: *Nyssomyia whitmani*, 27.1: *Psathyromyia lutziana*, 29.1: *Evandromyia edwardsi*, 29.2: *Evandromyia edwardsi*, 30.1: *Evandromyia edwardsi*, 1.1: *Brumptomyia* sp., 1.2: *Brumptomyia* sp., 1.5: *Brumptomyia* sp., 1.6: *Brumptomyia* sp., CP: controle positivo, CN: controle negativo.

Fonte: Autora

A partir da técnica molecular RFLP foi identificada a presença de DNA de *Leishmania infantum* em duas espécies, sendo elas *Ev. cortelezzii* coletada no ambiente de mineração e a *Ny. whitmani* registrada no ambiente de fazenda (Figura 9).

Figura 9: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados da PCR RFLP para identificação das espécies de *Leishmania* das fêmeas individuais de flebotomíneos coletadas nos meses de agosto e setembro no município de Pains/MG.



PM: Peso molecular 100pb, La: *Leishmania amazonensis*, Lb: *Leishmania braziliensis*, Li: *Leishmania infantum*, Lg: *Leishmania guyanensis*, 2: *Lu. longipalpis*, 3: *Ev. cortelezzii*, 4: *Lu. longipalpis*, 5: *Ny. whitmani*, 6: *Ps. lutziana*, 7: *Ev. edwardsi*, 8: *Ev. cortelezzii*, 9: *Ev. edwardsi*, 10: *Brumptomyia* sp. 11: *Brumptomyia* sp.

Fonte: Autora

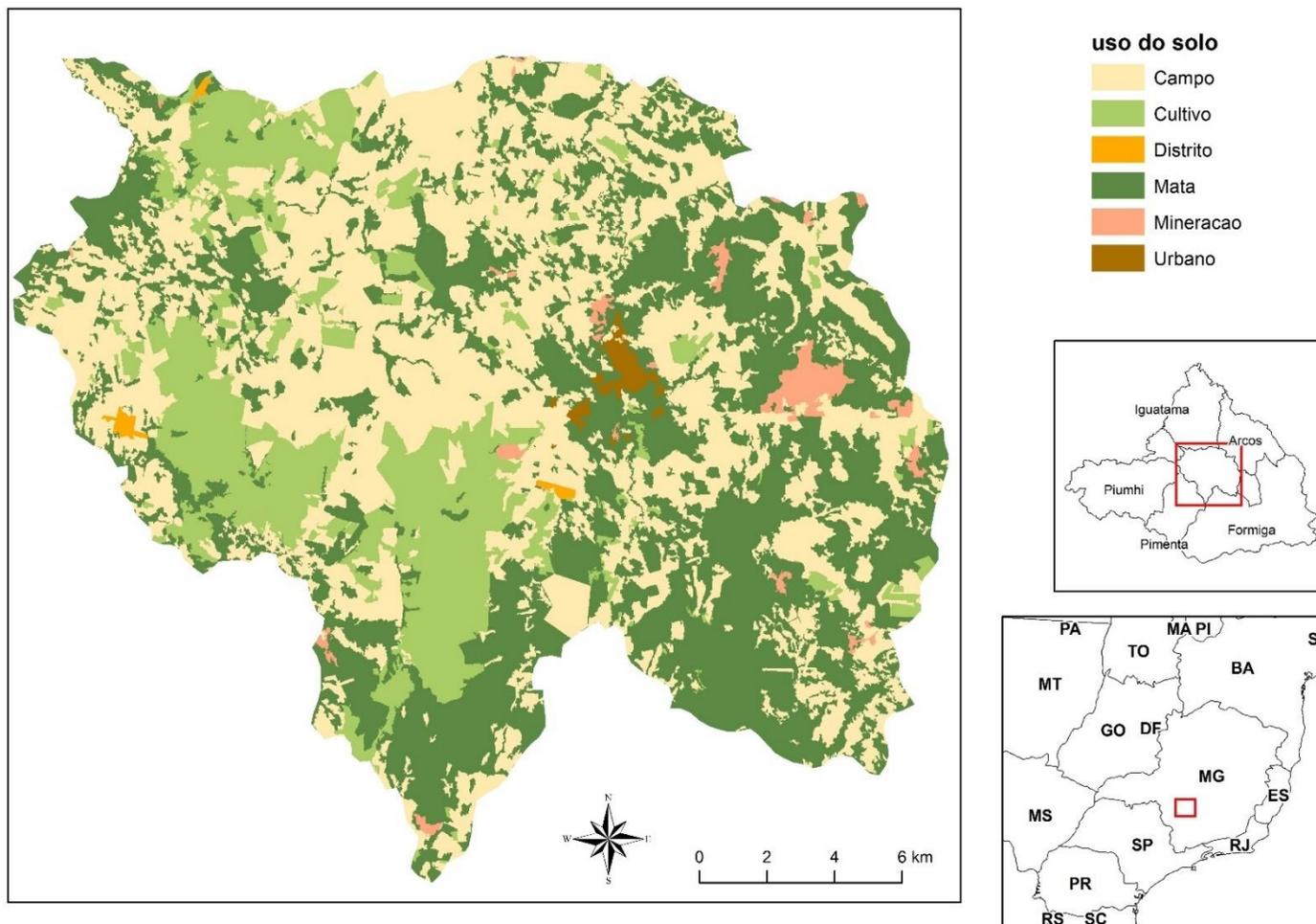
5.4 Geoprocessamento

A Figura 10 demonstra o resultado da criação do mapa base de uso e cobertura do solo do município de Pains, com seis classificações, campo, cultivo, distrito, mata, mineração e urbano; utilizando a classificação supervisionada da imagem de satélite CIBERS (2019).

Observa-se que o município apresenta uma mata nativa bastante fragmentada principalmente nas regiões norte, oeste e central.; uma vez que sua cobertura vegetal é bastante alterada devido a modificações geradas por ações antrópicas. Grande expansão territorial de solo de Pains apresenta características de cultivo e de campo, que são utilizados para atividades de agricultura e pecuária, principais atividades econômicas do município. As áreas de atividade mineradora de grande escala se concentram próximas à área urbana de Pains e possui em seu entorno mata nativa ou área de cultivo (Plantação de eucalipto).

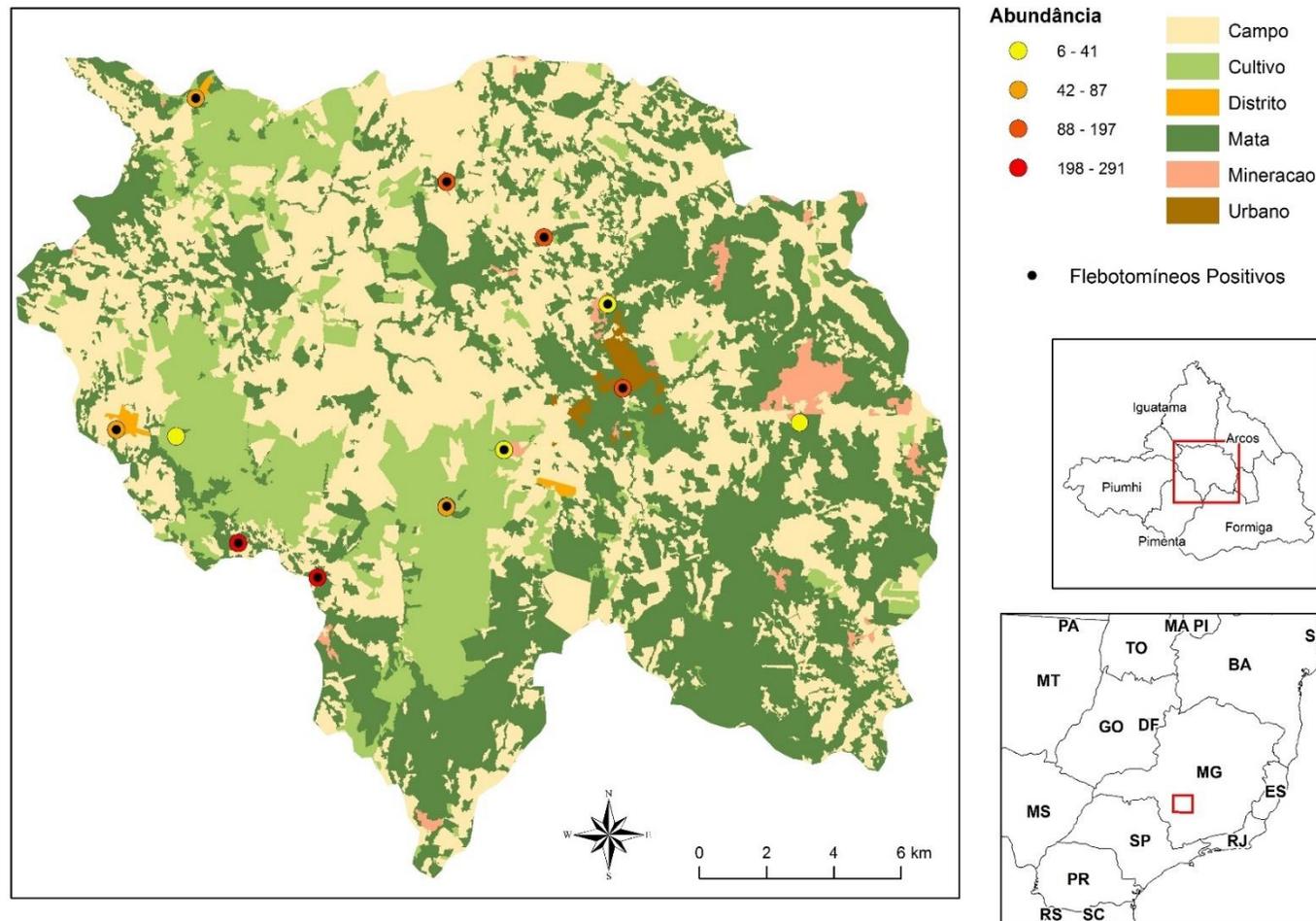
A figura 11 representa a distribuição espacial da densidade de flebotomíneos que foram capturados por ecótopos no mapa de uso e cobertura do solo do município com o objetivo de verificar a distribuição desses insetos por ambiente e demonstrar possíveis padrões espaciais, assim como a localização de presença de flebotomíneos que apresentaram presença de DNA de *Leishmania*. É possível observar a ampla distribuição de flebotomíneos em todo o município de Pains, apresentando maior abundância em ambientes de mata nativa e ambientes que apresentam fragmentos de mata próximos. A presença de flebotomíneos infectados naturalmente foi verificada em toda expansão territorial, apenas duas localidades não apresentaram positividade, um ambiente de mata nativa e outro ambiente de plantação de eucalipto.

Figura 10: Mapa de classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, derivados do processamento de imagens do satélite CIBERS 2 de 2019



Fonte: Débora e Vladimir, 2021

Figura 11: Mapa de distribuição espacial da densidade de flebotomíneos e presença de flebotomíneos positivos para DNA de *Leishmania* sobreposto a classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019



Fonte: Débora e Vladimir, 2021

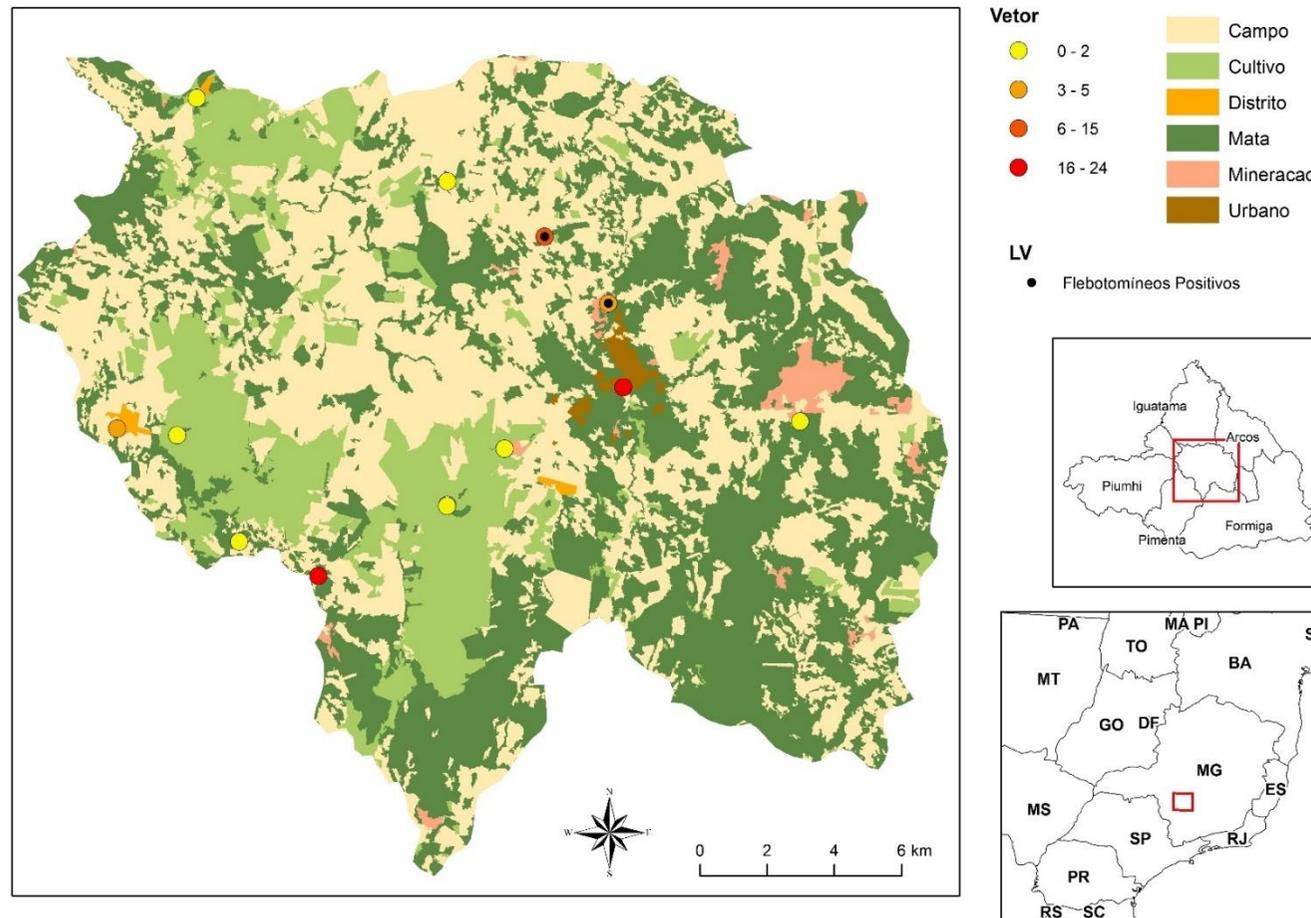
Na análise da distribuição de vetores comprovados de *Leishmania* foram desenvolvidos dois mapas. A figura 12 representa a distribuição espacial da densidade dos flebotomíneos vetores, *Lutzomyia longipalpis*, e a distribuição de espécimes que apresentaram positividade pra DNA de *Leishmania* durante as coletas no mapa de cobertura e uso do solo de Pains. A espécie *Lutzomyia longipalpis* foi registrada em todos os ambientes de estudo com exceção do ambiente cavernícola, e apresentou positividade para DNA de *Leishmania* em dois ambientes, de mineração e de fazenda (campo). No ambiente de mineração nota-se a proximidade com a área urbana e mata nativa no entorno e no ambiente de fazenda e é possível observar a presença de fragmentos de mata nativa nas proximidades.

Já na figura 13 foi representada a distribuição espacial da densidade de flebotomíneos vetor de leishmaniose tegumentar americana, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai* e *Migonemyia migonei*, e a distribuição de espécimes que apresentaram positividade pra DNA de *Leishmania* durante as coletas no mapa de cobertura e uso do solo de Pains.

As espécies vetores de LTA foram registradas em todos os ambientes de estudo, com ampla distribuição e apresentou positividade para DNA de *Leishmania* nos ambientes de fazenda, caverna e distrito, todos eles próximos a presença de mata nativa.

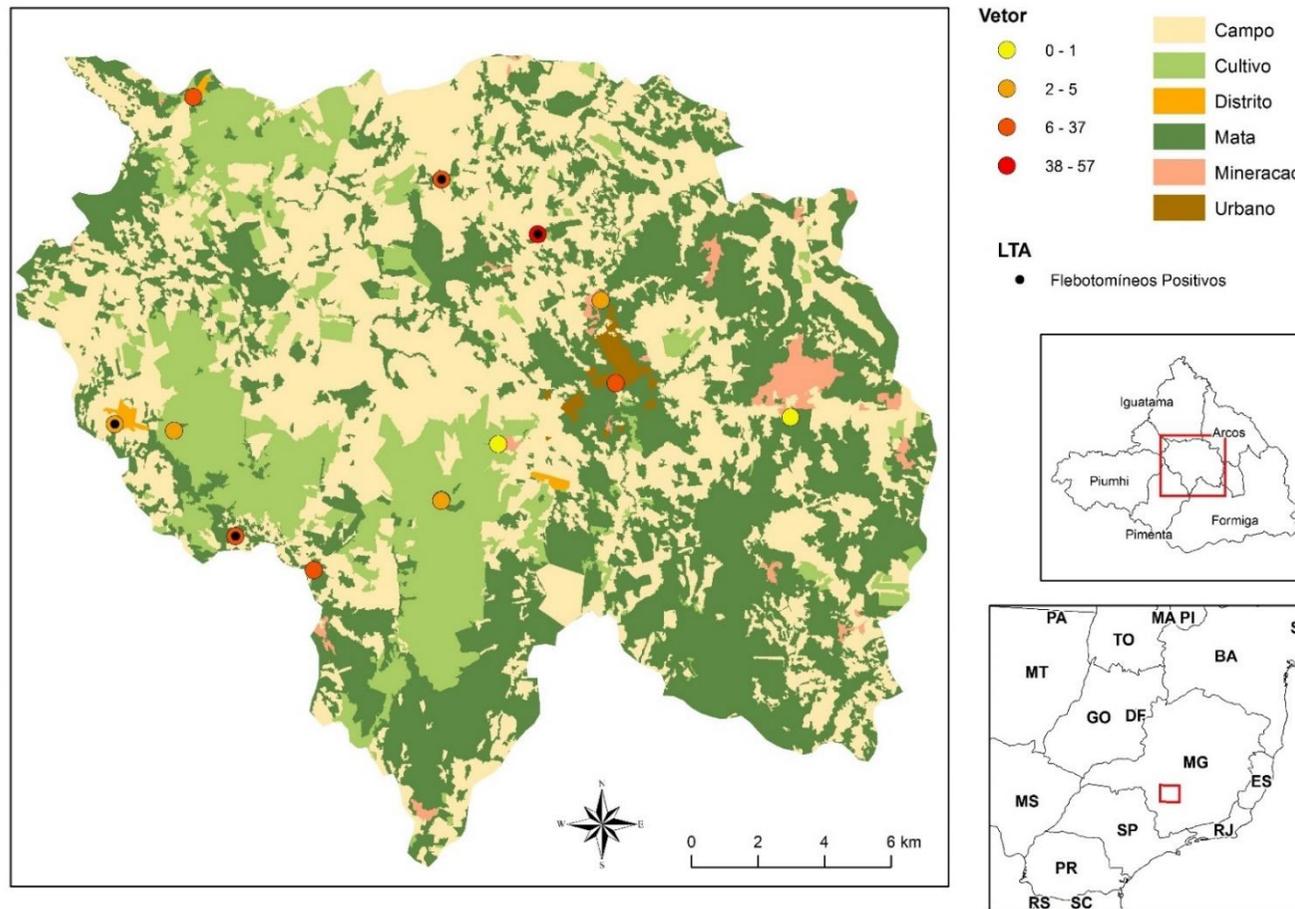
Os ambientes com diferentes características ambientais e graus de antropização apresentaram uma distribuição heterogênea para os vetores comprovados de *Leishmania*, demonstrando processo de adaptação desses insetos a diferentes graus de antropização.

Figura 12: Mapa de distribuição espacial da densidade de flebotomíneos vetores comprovados de transmissão no ciclo de LV (*Lutzomyia longipalpis*) e presença de flebotomíneos positivos para DNA de *Leishmania* sobreposto a classificação do uso e cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019



Fonte: Débora e Vladimir, 2021

Figura 13: Distribuição espacial da densidade de flebotomíneos vetores comprovados de participarem no ciclo de transmissão de LTA (*Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*) e presença de flebotomíneos positivos para DNA de *Leishmania* sobreposto a classificação da cobertura do solo no município de Pains, Minas Gerais, no período de agosto de 2018 a julho de 2019.



Fonte: Débora e Vladimir, 2021

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas de importância na saúde pública, que apresentam características ecoepidemiológicas extremamente complexas, quando analisada sua relação parasito-vetor-reservatórios. Outro fator adicional a sua complexidade são suas correlações e dinâmica com ambientes diversos, somadas a impactos ambientais, ocasionando em sua expansão e urbanização (ASFORD, 2000; BRASIL, 2010; DESJEUX, 2004).

O presente trabalho se destaca por ser um dos mais abrangentes no estudo do comportamento de populações de flebotomíneos em todos os ambientes existentes em um município, os fatores ambientais que podem interferir na urbanização das leishmanioses e a detecção de infecção por *Leishmania*.

Até o presente momento, foram registradas no município 28 espécies de flebotomíneos pertencentes a 10 gêneros, representando 28,57% de toda fauna já registrada no estado de Minas Gerais que compreende 98 espécies distribuídas em 16 gêneros (GALATI, 2019).

A fauna registrada no município de Pains mostrou-se diversa e abundante em todo o seu território, e bem distribuída entre os ambientes amostrados, com um total de 24 espécies pertencentes a 10 gêneros. Em comparação com estudos anteriores realizados em Pains, não foram capturados neste estudo quatro espécies: *Evandromyia bourrouli*, *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia nitzulescui* e *Evandromyia bacula*. Porém foram registradas duas espécies ainda não capturadas no município, *Brumptomyia pinto* e *Evandromyia walkeri*. (CAMPOS et al., 2017; SILVA, 2019).

Os flebotomíneos foram coletados nos sete ambientes de estudo e em todos os pontos, esse resultado demonstra uma ampla circulação desses insetos em todo município de Pains. Destacando as espécies *Brumptomyia cunhai*, *Evandromyia cortelezzii*, *Nyssomyia whitmani* e *Sciopemyia sordellii* que foram capturadas em todos os ecótopos, demonstrando alta adaptabilidade dessas espécies na região. Observou-se que as comunidades de flebotomíneos foram similares entre os

ambientes, sugerindo que todos os ambientes possuem importância para a manutenção das populações de flebotomíneos.

O gênero *Evandromyia* foi o mais abundante e com maior riqueza de espécie. Das espécies coletadas as mais abundantes foram *Ev. edwardsi*, *Ev. lenti*, *Mi. quinquefer* e *Ny. whitmani*. Diversos estudos mostraram que as três primeiras são vetores suspeitos do agente etiológico de LTA e *Ny. whitmani* é incriminada como a espécie responsável pela transmissão de LTA. (SUCEN, 2005; MARGONARI et al. 2010; LANA et al., 2015; SANGUINETTE, 2011; PAIVA, 2010; SILVA, 2019; SOUZA, 2011; AGUIAR & MEDEIROS, 2003; ANDRADE FILHO et al., 1997; BRAZIL et al., 2015)

Algumas espécies capturadas são consideradas por muitos autores como potencialmente vetores de *Leishmania*, mas seu papel epidemiológico ainda precisa ser avaliado. De acordo com Killick-Kendrick (1990) para incriminar uma espécie como vetor de leishmaniose é necessário seguir os seguintes critérios: possuir distribuição espacial em áreas de ocorrência dos casos de infecção humana; ser infectado naturalmente por parasitos da mesma espécie de *Leishmania* que infecta os seres humanos; se alimentarem em mamíferos reservatórios de *Leishmania*; confirmar a capacidade dos flebotomíneos de se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasito, através da picada em experimento laboratorial durante o repasto sanguíneo.

A espécie mais abundante do estudo, *Evandromyia edwardsi* é frequentemente registrada em ambientes de mata, áreas marginais, abrigos de animais silvestres e ambientes rochosos (CASTELO, 2015), corroborando com nossos resultados em que se obteve maior número de exemplares coletados no ambiente de caverna, com 73,91%. Essa espécie já foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis* no município de Cotia, São Paulo, representando uma possível participação dessa espécie no ciclo de transmissão de LTA (SUCEN, 2005).

Evandromyia lenti, segunda espécie com mais exemplares, foi a espécie mais abundante no ambiente de fazenda com 79.44% dos espécimes capturados. Essa espécie foi com presença de DNA de *Le. braziliensis* em Divinópolis/MG (MARGONARI et al. 2010); *Le. infantum* e *Le. brasiliensis* em Várzea da Palma/MG

e Jaboticatubas/MG (LANA et al., 2015; SANGUINETTE, 2011). Já Leite (2015) registrou essa espécie com DNA de *Le. amazonensis* em Nova Andradina/MS, mas em estudo realizado por Brazil (1997), a espécie *Ev. lenti* se demonstra refratária a infecção por *Le. amazonensis*, sendo necessário novos estudos de infecção por *Leishmania* nessa espécie. Em estudo realizado por Galati et al. (1996) *Ev. lenti* foi registrada em abundância em poleiros e pocilgas em zonas rurais no Mato Grosso do Sul, corroborando com nosso estudo que apresentou grande relação dessa espécie com ambiente de fazenda, onde as armadilhas foram dispostas em pocilga e curral.

A espécie *Mi. quinquefer* apresentou predominância nos ambientes de mata, caverna e urbano. Sua presença já foi relatada em ambiente cavernícola (BARATA et al., 2012; CARVALHO et al., 2013) e já foi encontrada em tronco de árvores, fendas de rochas, e próximos a animais domésticos e de criação (TEODORO, 2019). Seu hábito alimentar é conhecido por se alimentar de animais de sangue frio, não possuindo papel confirmado para a transmissão de *Leishmania*. Mas estudos registraram essa espécie com presença de DNA de *Le. braziliensis*, sugerindo que esses animais podem se alimentar de mamíferos por oportunismo (PAIVA, 2010; SILVA, 2019; SOUZA, 2011).

Nyssomyia whitmani apresenta importância epidemiológica no ciclo de transmissão de LTA uma vez que é uma espécie comprovada como principal vetor de *Le. braziliensis* nas regiões sudeste, sul, nordeste e centro-oeste do Brasil; como também vetor de *Le. shawi* e *Le. guyanensis* em outras partes do Brasil (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; ANDRADE FILHO et al., 1997; BRAZIL et al., 2015). Peterson e Shaw (2003) observaram que essa espécie pode tolerar mudanças ecológicas extremas. Muitos estudos demonstram que *Ny. whitmani* em processo de adaptação ao ambiente antrópico, sendo associadas a diferentes tipos de vegetação e condições climáticas. Seu hábito alimentar é caracterizado como oportunista e eclético, se alimentando conforme a disponibilidade de hospedeiros (ALVES et al., 2012; ALVES et al., 2020; BARRETO, 2011; CARVALHO et al., 2014; DORVAL et al., 2009; LOIOLA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2003; READY et al., 2018).

Ny. whitmani foi registrada em todos os ambientes, e a presença dessa espécie em ambiente silvestre e antrópicos foi observado por Alves et al (2012). Sua

predominância em fazenda, mata, distrito e ambiente urbano, levanta a hipótese dessa espécie ser a principal suspeita no ciclo de transmissão de LTA em Pains, e também foi encontrada naturalmente infectada com DNA de *Le. infantum* no ambiente de fazenda.

A espécie *Nyssomyia neivai* é comprovada como vetor de *Le. braziliensis*, agente etiológico para LTA em várias regiões do Brasil. (ANDRADE FILHO et al., 2007; BRAZIL et al., 2015; MARCONDES, 2009). No estado de Minas Gerais ressalta-se o estudo realizado por Saraiva et al. (2009) que registrou *Ny. neivai* infectada naturalmente por *Le. infantum* e Margonari et al. (2010) relatou a presença de *Ny. neivai* infectada naturalmente por *Leishmania* sp. no município de Divinópolis, região centro oeste de Minas Gerais, em área silvestre.

Essa espécie é altamente antropofílica, sendo registradas e adaptada à ambientes alterados por humanos e em áreas residenciais. Seu hábito alimentar é considerado eclético e oportunista, regulando sua preferência alimentar a disponibilidade de hospedeiros, se alimentando de animais domésticos como porco, cachorro, galinha e coelho (ANDRADE FILHO, 2007; CASANOVA et al., 2005; DIAS-SVERSUTTI et al., 2007, LEITE, 2015). Em nosso estudo *Nyssomyia neivai* teve uma expressiva presença no ambiente de distrito, registrando 70% dos exemplares coletados, representando alta sinantropia e podendo ser um potencial vetor atuando na transmissão de leishmanioses tegumentar na zona rural de Pains.

Lutzomyia longipalpis foi registrada em cinco dos sete ambientes, com exceção da caverna e plantação de eucalipto. Sua presença é significativa por ser o principal vetor de *Le. infantum*, responsável pela leishmaniose visceral nas Américas, incluindo o Brasil (BRASIL et al., 2015; LAISON & RANGEL, 2005; VALERO, 2020).

Lainson e Rangel (2005) demonstraram que *Lu. longipalpis* possui origem silvestre e gradualmente se adaptou a zona rural e zona urbana, demonstrando alto grau de adaptabilidade a ambientes antrópicos (BRAZIL, 2013; DIAS et al., 2011; LANA et al., 2018; SALOMON et al., 2015; SOUZA et al., 2004) sendo encontrada predominantemente nesse ambiente. Sua plasticidade adaptativa é favorecida pelo seu hábito alimentar eclético, possuindo como fonte alimentar uma grande gama de

vertebrados como animais silvestres (roedores, raposas, tatus e gambás), animais domésticos e de criação (cães, suínos, equinos, bovinos e galinhas) e grande atração por humanos (DIAS-LIMA, 2003; MACEDO-SILVA et al., 2014).

Silva (2019) encontrou essa espécie infectada por *Le. braziliensis*, apesar de não ser incriminada como vetor para LTA. Desta forma, reforça-se a importância dessa espécie para as diversas formas clínicas da leishmaniose no município de Pains, uma vez que possui predominância do ambiente urbano, fazenda e de mata. Seu potencial vetorial, plasticidade adaptativa, hábito eclético alimentar, proximidade a humanos, é de extrema importância para saúde pública do município (DORVAL, 2009; SALOMON, 2015).

O registro de *Mg. migonei* em seis dos sete ambientes (exceção da plantação de eucalipto) é de extrema importância uma vez que essa espécie desempenha papel no ciclo de transmissão de LTA, possuindo hábito de se alimentar em galinhas, cães e humanos. Essa espécie foi encontrada em diversos trabalhos infectada naturalmente com DNA de *Leishmania* (ANDRADE FILHO et al., 1997; AZEVEDO et al. 1990; BRAZIL et al., 1991; BRAZIL et al., 2015; CARVALHO et al., 2010; LOILA et al., 2007; MASSAFERA et al., 2005; MARGONARI et al, 2010; PITA-PEREIRA et al., 2005; QUEIROZ et al. 1994; RANGEL et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2013). *Migonemyia migonei* pode desenvolver um papel no ciclo de transmissão de LV, com registros de infecção natural e laboratorial por *Le. infantum* (ALEXANDRE et al, 2020; CARVALHO et al., 2010; MAROLI et al., 2013, MOYA et al., 2015; SALOMON., 2010). Guimarães et. (2016) verificou que a espécie *Mi. Migonei* é permissível a várias *Leishmania* spp., demonstrando-se altamente suscetível ao desenvolvimento de *Le. infantum*, evidenciando a importância de estudos uma vez que apresenta alta plasticidade ambiental no município de Pains, podendo atuar como vetor secundário na transmissão de LV.

Pintomyia pessoai foi encontrada em ambiente de mata, eucalipto, fazenda e mineração, sua presença nesses ambientes merece atenção devido às evidências de que essa espécie possa participar da transmissão de *Le. braziliensis* no sudeste do Brasil, sendo encontradas infectadas naturalmente em alguns trabalhos (COUTINHO, 1940; VIEIRA, 2019). A presença dessa espécie no ambiente de

mineração pode estar correlacionada com registro de antropofilia da mesma (FORATTINI, 1972; RANGEL & LAINSON, 2009).

A espécie *Ev. termitophila* foi registrada nos ambientes de mata, eucalipto e fazenda, e é frequentemente encontrada em trabalhos entomológicos em Minas Gerais. (PEREIRA, 2019; SARAIVA et al., 2010; SILVA, 2019). Apesar de não possuir importância epidemiológica comprovada, já foi encontrada infectada naturalmente por *Le. infantum* em Belo Horizonte (SARAIVA et al., 2010) e em Várzea da Palma foi encontrada com *Le. infantum* e *Le. braziliensis* (SANGUINETTE et al., 2015; SANGUINETTE, 2011).

A espécie *Ev. cortelezzii* apresentou abundância nos ambientes de distrito e urbano, e foi encontrada naturalmente infectada com DNA de *Le. infantum* no ambiente de mineração. Silva (2019) encontrou essa espécie com presença de DNA de *Leishmania* na área urbana de Pains por *Le. infantum*. *Ev. cortelezzii* representa um potencial vetor em Minas Gerais, existindo registros de infecção natural por *Le. infantum* e *Le. braziliensis* em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; SARAIVA et al., 2010;2009).

Sciopemyia sordellii apresenta um comportamento silvestre associada a cavernas, não sendo encontrada frequentemente em áreas antrópicas. Seu registro em todos os ambientes do estudo evidencia uma possível adaptação desse inseto a ambientes modificados. Apesar não ser um vetor comprovado, já foi encontrada com DNA de *Leishmania* (GUIMARÃES et al., 2014; LEITE, 2015; PINHEIRO et al., 2013).

As espécies *Ex. firmatoi* e *Pi. fischeri* são consideradas espécies antropofílicas possuindo atividade no período diurno e noturno e foi encontrada em poucos exemplares nos ambientes de mata, eucalipto, mineração e urbano (BRAZIL et al., 1991; DINIZ et al., 2014; MASSAFER et al., 2005; RANGEL et al., 2009).

A espécie *Lu. renei* foi registrada por apenas dois exemplares, sendo um no ambiente de caverna e outro no ambiente urbano, diferentemente dos estudos de Silva (2019) e Campo et al., (2017) no município de Pains nos quais os autores registraram alta abundância dessa espécie. *Lutzomyia renei* em experimentos laboratoriais apresentou condição de infecção e transmissão de *Leishmania*

(COELHO & FALCÃO, 1962; GONTIJO et al., 1987), e foi com DNA de *Le. guyanensis* (RÊGO et al. 2015) sendo que a presença de *Le. infantum* em flebotomíneo foi relatada pela primeira vez no município de Pains (SILVA, 2019).

Pintomyia monticola foi encontrada predominantemente no ambiente de mata com 86.36% dos exemplares. Margonari et al., (2010) registrou em Minas Gerais essa espécie com DNA de *Le. brasiliensis* em Divinópolis em área de mata e Silva (2019) encontrou um exemplar com DNA de *Leishmania sp.*

Foi observado que o número total de fêmeas foi maior do que o de machos com razão fêmea/macho de 1.07/1, corroborando com o registro de Campos et al., (2014) e Rêgo et al., (2015). O padrão epidemiológico dos sexos nos diversos trabalhos faunísticos ainda não foi elucidado, mas em sua maioria a presença de machos sobressai à das fêmeas (LOIOLA, 2007; SILVA, 2019). A diferença de abundância nas capturas entre os sexos pode estar associada a diversos fatores e metodologia utilizadas como: o tipo de armadilha de captura que pode interferir na atração de forma diferente para os sexos, dispor armadilhas em ecótopos com disponibilidade de fonte de alimentação ou próximas a criadouros, as fêmeas após o repasto sanguíneo buscam abrigo para realizar a digestão se mantendo em repouso e que machos formam agregados com o objetivo de acasalar com fêmeas (AGUIAR et al., 1985; BARRETO, 2011, BARRETTO, 1943; DOMINGOS et al., 1998; FELICIANGELI, 1987).

Os habitats dos flebotomíneos são caracterizados por apresentarem pouca variação na temperatura e umidade, pois são fatores essenciais para a presença desses insetos visto que seus criadouros, necessitam de umidade e presença de matéria orgânica, já que esses insetos apresentam sensibilidade a alta temperatura devido a dessecação (DIAS, 2007; MAROLI, 2013). Fatores climáticos como pluviosidade, umidade e temperatura são conhecidos por influenciarem na ocorrência de flebotomíneos de acordo com a área de estudo (DIAS et al., 2007), outro fator influenciável na relação da dinâmica desses insetos foi efeito do El Niño; demonstrando que o longo período de seca provocado por esse fenômeno alterou o número de casos de leishmanioses na população, aumentando consideravelmente, e a abundância da população dos flebotomíneos

também sofreu alterações, aumentando a intensidade de transmissão da doença (FRANKE et al., 2002).

Os flebotomíneos da área de estudo foram capturados durante todo o período de estudo, mas a maior densidade ocorreu entre os meses outubro a fevereiro correspondendo a estação chuvosa no estado de Minas Gerais (DOS REIS, 2005).

De acordo com Forattini (1960), quando analisada a variação sazonal de flebotomíneos, foi possível verificar que nos meses considerados quentes e úmidos (dezembro a fevereiro), a abundância de flebotomíneos foi maior, quando comparada aos meses frios e secos (junho a agosto) que tiveram baixa densidade de exemplares. Em um estudo realizado no município de Porteirinha (MG), Barata et al., (2004) identificou relação entre os fatores climáticos (umidade e pluviosidade) e a abundância de exemplares de flebotomíneos capturados interferindo em sua dinâmica populacional, mas quando analisada a temperatura não houve associação.

Não foi possível no presente trabalho correlacionar os fatores climáticos (temperatura, umidade e pluviosidade) com o número de indivíduos coletados. A correlação não-significativa pode estar relacionada a pouca variação climática durante o período de estudo, corroborando com o estudo de Silva (2019) na área urbana de Pains e outros estudos realizados no estado de Minas Gerais (NASCIMENTO, 2013; RÊGO, 2013; TANURE, 2017). Para realizar um estudo de sazonalidade confiável e consistente, é necessário um estudo com duração mínima de dois anos consecutivos, para reduzir margens de erros proporcionados por anos atípicos (DIAS, 2007) e a pesquisa de dados climatológicos por localidade de armadilhas, para dados fiéis a análise de microclima.

De acordo com os valores de frequência de constância das espécies, 15 espécies consideradas constantes ocorrendo em mais de 50% das coletas, ressaltando as espécies *Ev. cortelezzi*, *Ev. edwardsi*, *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* que tiveram registro em todos os meses de coleta, demonstrando sua alta plasticidade entre estação seca e chuvosa e importância epidemiológica uma vez que são vetores suspeitos e comprovados de *Leishmania* podendo apontar para uma possível transmissão durante todo o ano.

A presença de flebotomíneos ocorre com frequência em ambientes naturais, sendo encontrados em solo úmido rico em matéria orgânica, tronco de árvores, folhas caídas no solo, aberturas em rochas, cavernas e tocas de animais que servem como fonte alimentar, mas sua presença vem sendo registrada em ambientes rurais e urbanos se alimentando de animais domésticos, demonstrando a adaptabilidade desses insetos em ambientes alterados (GALATI et al., 2003; TOLEZANO et al., 2001).

Os ambientes mais abundantes de registro de flebotomíneos foram o de mata, caverna e fazenda, devido ao fato de apresentarem maior disponibilidade de recursos de fonte alimentar para os flebotomíneos e ambiente favorável para seus criadouros.

Quando analisada a diversidade (H') e equitabilidade (J') da comunidade de flebotomíneos, foi possível observar valores próximos indicando uma diversidade próxima entre si e a distribuição de indivíduos entre as espécies foi uniforme. Com exceção do ambiente de caverna que obteve valores distantes dos demais ambientes, devido ao fato de possuir o registro de duas espécies que foram bem mais abundantes que as demais.

Apesar das diferenças entre as características paisagísticas dos ambientes do estudo, a uniformidade registrada nos demais ambientes se deve possivelmente a proximidade com fragmentos de mata. O teste estatístico de permutação para avaliar a similaridade das comunidades de espécies de flebotomíneos entre os diversos ambientes mostrou que a abundância relativa e ocorrência das espécies não diferiram entre os ambientes, o que indica que todos os ambientes amostrados são favoráveis para a manutenção das comunidades de espécies de flebotomíneos.

A presença desses insetos no ambiente de mineração é de extrema importância para o conhecimento desses insetos, pois esse ecótopo não apresenta características ambientais propícias para o desenvolvimento dos flebotomíneos (ambiente seco e quente), ausência de matéria orgânica ou fonte alimentar animal.

Em alguns estudos realizados na Guiana Francesa foi relatado a infecção por *Leishmania* sp. de funcionários da indústria de mineração durante o período de trabalho e alta taxa de migração dos funcionários das mineradoras para outras localidades, para realizar transporte de carga e hospedagem, sendo a migração de

peças infectadas um dos fatores de expansão das leishmanioses (DUCHARME et al., 2020; DOUINE et al., 2018; D'ANDREA & GUIMARÃES, 2018; PATZ et al., 2004).

As espécies vetores comprovadas de *Leishmania* spp. foram encontradas em todos os ambientes, e tiveram sua abundância em ambientes com alterações humanas (urbano, fazenda e distrito). CONFALONIERI et al (2014) e VALDERRAMA et al (2011) relatam a dominância de espécies vetores em ambientes modificados, evidenciando a plasticidade adaptativa dessas espécies. A distribuição desses vetores comprovados como também a presença de vetores não incriminados nos diferentes ecótopos do município representa a importância do conhecimento da ecologia/dinâmica desses insetos e seus diferentes perfis epidemiológicos para direcionamento de ações de controle.

Brumptomyia brumpti, *Evandromyia cortelezzi*, *Nyssomyia whitmani*, *Sciopemyia sordellii* foram registradas em todos os ambientes de estudo, demonstrando estarem adaptados a ambientes silvestres e com modificações humanas em diferentes graus.

Apesar de o estado de Minas Gerais apresentar 45.76% dos registros de cavidades naturais no Brasil, estudos referentes a fauna e ecologia dos flebotomíneos não são recorrentes, existindo poucos dados registrados no estado sobre esses insetos, principalmente correlacionando a fauna com os efeitos negativos de ações antrópicas (CARVALHO et al., 2013; CAMPOS et al., 2016; CAMPOS, 2020; CEVAV, 2020; BARATA, 2012). O município de Pains se destaca por possuir 15.98% das cavidades registradas em MG e por dispor de grande influência socioeconômica de atividades mineradoras. Atividades que exercem efeitos negativos na conservação das cavidades naturais da região, como alteração nos habitats do entorno, destruição das cavidades naturais, poluição e redução de recursos hídricos, causando declínio ou até mesmo extinção de populações locais (CEVAV, 2020; IBGE, 2019). Teixeira e Dias (2003) realizaram um levantamento espeleológico nos municípios de Pains, Arcos, Córrego Fundo, Iguatama e Doresópolis e relataram que as cavernas estão altamente vulneráveis a degradação gerada pelas empresas mineradoras da região.

De acordo com Banducci Jr & Lobo (2012) as cavernas em todo território nacional estão sofrendo com uma crescente procura por turistas que estão em busca de atividades em ambientes naturais. Em consequência, é necessário um conhecimento extenso desse ambiente que podem ser favorável a transmissão de doenças. O estudo em ambientes cavernícolas se mostra de extrema importância para ampliação do conhecimento e conservação dos ecossistemas sensíveis ali existentes, uma vez que detém espécies que executam serviços ecológicos; como os morcegos que são importantes polinizadores, dispersores de sementes e predadores de insetos (BOYLES et al., 2011; KUNZ et al., 2011). Animais vertebrados que utilizam caverna como abrigo como os morcegos, pássaros, lagartos, anfíbios e roedores podem ser considerados importantes fontes de alimento para os flebotomíneos e até mesmo servir como reservatórios de *Leishmania* (CASTRO, 2020; COSTA et al., 2021; DE CASTRO FERREIRA, 2017; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, 2017; SHAPIRO, 2013; TEODORO, 2021).

No ambiente de caverna foram registradas 14 espécies de flebotomíneos pertencentes a nove gêneros. O gênero com maior número de espécimes coletados foi *Evandromyia*, com três espécies. Esse dado corrobora com resultados apresentados em outros trabalhos em Minas Gerais e outros estados. Comparado a estudos anteriores, 10 espécies registradas por Campos et al. (2016) não foram registradas no nosso estudo. As espécies com maior número de exemplares capturados foram *Evandromyia edwardsi* (62.5%) e *Micropygomyia quinquefer* (19.12%).

A espécie *Brumptomyia cunhai* não havia sido registrada no ambiente de caverna no estudo anterior (CAMPOS et al., 2016), mas outros autores já registraram essa espécie em parede externa de caverna e na zona afótica em Minas Gerais e São Paulo (BARATA, 2012; GALATI et al., 2010).

A espécie *Sciopemyia microps* foi capturada exclusivamente no ambiente de caverna apresentando restrita relação com esse ambiente, sendo essa característica também observada nos estudos realizados em cavernas cársticas de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul que registraram essa espécie em número reduzido, ressaltando a importância desses registros, devido aos limitados dados na literatura

dessa espécie (CAMPOS et al., 2016; CARVALHO et al., 2013; COSTA et al., 2021; GALATI et al., 2003; GALATI et al., 2010; TEDORO, 2019).

Os ecótopos cavernícolas possuem características ambientais favoráveis para o estabelecimento dos flebotomíneos devido à ausência de luz solar, e a estabilidade das condições climáticas, se mantendo sempre úmidos, com temperatura com poucas variações, possuindo um microclima estável quando relacionado ao ambiente externo (FREITAS, 2010; POULSON E WHITE, 1969).

Os dados referentes à localização das armadilhas na caverna, mostra que as armadilhas dispostas na entrada da caverna e na zona crepuscular representam 89,70% do total de flebotomíneos capturados. Com algumas espécies restritas somente à entrada, e outras comuns a todos as três zonas da caverna (entrada, penumbra e afótica), que podem indicar que esses insetos utilizam o ambiente cavernícola como local de abrigo, proteção, criadouros e alimentação, uma vez que o solo das cavernas apresenta rica matéria orgânica como excrementos de animais, restos vegetais e animais, anfíbios, morcegos e temperatura e umidade com pouca variação. Resultados semelhantes relatados por Campos et al. (2020); Carvalho et al (2013) e Galati et al. (2003). A maior diversidade e riqueza de espécies na zona crepuscular e entrada, pode estar relacionada ao aumento de oferta de alimentos correlacionada à possibilidade de abrigo, conforme relatado por Carvalho et al (2013). Estudos da fauna em ambiente de caverna correlacionados a impactos ambientais, possui como propósito advertir sobre distúrbios no ecossistema, perdas biológicas, riscos notáveis à turistas e dinâmica das leishmanioses nesse ambiente.

O ambiente de plantação de eucalipto apresenta um solo com serapilheira composta principalmente por folhas, galhos e gramíneas, mesmo apresentando pouca quantidade de matéria orgânica em decomposição, a serapilheira retém umidade no solo (SANTOS, et al., 2017). PINHEIRO et al., (2013) observou em ambiente agroflorestal que os flebotomíneos utilizavam o *eucalyptus* sp. como fonte alimentar, sendo registrados monossacarídeos presentes na seiva do *eucalyptus* nos flebotomíneos investigados. O ambiente de plantação de eucalipto foi o segundo com maior riqueza entre os ambientes estudados com 15 espécies (62,5%) registradas, registrando a presença de espécie exclusiva: *Evandromyia teratodes*.

Leite (2015) registrou pela primeira vez DNA de *Le. brasiliensis* nessa espécie no estado de Mato Grosso do Sul.

Em contrapartida, a riqueza presente no ambiente de eucaliptos, muitas espécies capturadas foram registradas apenas uma vez, por ser um ambiente com fragmentos de mata próximos essas espécies podem ter sido capturadas em um momento de movimentação desses insetos de um fragmento de mata para outro, a baixa abundância pode ser evidenciada pelo fato de possuir menos atrativos para o repasto sanguíneo.

A relação entre biodiversidade, ecossistemas alterados e doenças são extremamente complexas por abordarem diversos fatores, mas em muitos trabalhos é evidenciado que a biodiversidade pode atuar na proteção para saúde humana, diminuindo o risco de dispersão de doenças (MONTIRA et al, 2009; OSTFELD, 2009; KEESING et al., 2010). A perda da biodiversidade relacionada às mudanças climáticas podem influenciar na abundância, diversidade, composição e expansão de vetores, abundância e diversidade de reservatórios importantes para o ciclo de transmissão. E a fragmentação de habitats/ alteração ambiental elevam o contato humano com vetores e reservatórios infectados gerando condições ideais para introdução ou reintrodução de patógenos em áreas antropizadas, afetando diretamente na transmissão de doenças zoonóticas (ELLWANGER, 2020; OSTFELD, 2009; KEESING et al., 2010).

A hipótese do efeito de diluição pode ser utilizada para exemplificar a importância da biodiversidade para as leishmanioses, pois os flebotomíneos que são registrados em áreas com declínio de diversidade de hospedeiros para se alimentarem, possuem grande viabilidade de utilizarem como fonte alimentar um reservatório competente para *Leishmania*, o que possibilita uma maior probabilidade de se infectarem com o patógeno durante o repasto. Supostamente o oposto deveria ser observado com a viabilidade de maior diversidade de hospedeiros, pois os vetores disporiam de uma maior abundância de fonte alimentar, diminuindo a probabilidade de se alimentarem em um reservatório infectado ou até mesmo em um hospedeiro não competente para transmissão (MCCALLUM, 2015; SCHMIDT & OSTFELD, 2001; KEESING & OSTFELD, 2006).

As leishmanioses evidenciam a importância da biodiversidade para impedir expansão dessas doenças no município uma vez que podem atuar na hipótese de efeito de diluição. Chamando atenção para conservação dos ambientes de mata nativa, uma vez que eles foram detentores da maior riqueza e abundância de espécies no estudo, mostrando-se importantes para manutenção de flebotomíneos.

6.1 Geoprocessamento: Distribuição espacial dos flebotomíneos e o uso e classificação do solo no município de Pains

A partir da análise dos dados, utilizando a ferramenta de SIG, observou-se que o uso e cobertura do solo do município de Pains é bastante fragmentada, devido às alterações humanas, que modificam a cobertura vegetal para realizar atividades econômicas. Esses resultados estão de acordo com as características de pólo econômico do município, segundo o IBGE (2020) cerca de 51% do solo do município está direcionado para uso da pecuária e agricultura. As intensas ações antrópicas associadas às atividades econômicas geram impacto ambiental e consequentemente a perda de biodiversidade local.

Confalonieri et al (2014), Gottdenker et al (2014) e Patz et al (2004), enfatizam que as modificações antropogênicas no uso da terra apresentam interferência na ecologia e dinâmica de doenças infecciosas que possuem o ambiente silvestres como habitat natural, exemplificando as leishmanioses como uma dessas doenças. As leishmanioses sofrem constantes pressões na adaptação dos flebotomíneos acarretadas pelos impactos ambientais e urbanização, demonstrando em estudos recentes, modificação do perfil epidemiológico da enfermidade, no comportamento e composição de vetores, resposta imunológica e contato entre hospedeiros e vetores (DEANE & DEANE, 1955; CONFALONIERI et al., 2013; GOTTDENKER et al, 2014. MARZOCHI et al., 1985).

O registro de uma espécie em um determinado ecótopo se deve ao seu poder adaptativo às condições climáticas, disponibilidade de recursos para abrigo e criadouro e plasticidade alimentar (RICKLEFS, 2003). Sendo assim, a relação entre cobertura vegetal e abundância/diversidade de flebotomíneos se deve à disponibilidade de condições favoráveis ao seu desenvolvimento e sobrevivência.

As espécies registradas em ambientes modificados, se caracterizam por serem espécies antropofílicas ou em processo de adaptação, uma vez que migram

para áreas com habitações humana em busca de fonte de alimento e abrigo, quando seu habitat natural sofre modificações. Sendo assim a distribuição espacial dos flebotomíneos é caracterizada pela plasticidade, especialidade e adaptação das espécies em relação ao ambiente. A especialização está diretamente relacionada a sua dispersão, no qual, quanto mais generalista for a espécie, maior será sua distribuição geográfica, e quanto maior for a especialização da espécie, menor será seu raio de dispersão (AGUIAR & MEDEIROS, 2003).

A proximidade de locais com cobertura vegetal mais densa juntamente com a criação de animais domésticos proporciona uma atração dos flebotomíneos, oportunizando uma interação do ciclo silvestres com os ciclos peridomicílio e doméstico, e conseqüentemente favorecendo na manutenção de populações desses insetos (FIGUEIREDO et al., 2017).

Ao analisar a distribuição dos flebotomíneos no município de Pains, é possível observar uma ampla distribuição espacial em todo território, sendo registrada a presença desses insetos em todos os pontos de coleta e ecótopos de estudo, representando ampla plasticidade ambiental. Apresentando maior abundância em área de mata, fazenda e caverna que possuem características mais apropriadas para seu ciclo de vida. Silva (2019) enfatiza em seu estudo na área urbana de Pains, que muitos domicílios urbanos possuem características rurais, formando um habitat propício para o ciclo de vida dos flebotomíneos bem como presença de fonte de alimentação.

Os mapas gerados com a distribuição de vetores comprovados de *Leishmania* do ciclo de LV e LTA, representam a heterogeneidade desses insetos quanto ao ambiente, estando presentes em todos os ecótopos com diferentes características paisagísticas e epidemiológicas, apresentando distintos graus de modificações ambientais. Quando observado os ambientes de presença de vetores comprovados de LV e LTA, os vetores *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia neivai* e *Migonemyia migonei* foram registradas em todos os ecótopos, se concentraram nos ambientes de fazenda (32,02%), distrito (20,79%), e mata (19,10%), caverna (12,92%). Já a espécie *Lu. longipalpis* não foi registrada no ambiente de caverna e plantação de eucalipto, apresentando maior abundância nos ambientes urbano (36,92%), mata (33,84%) e fazenda (23,07%).

Ressaltando a presença dos vetores no ambiente de mineração, que mesmo com poucos exemplares capturados, teve o registro de flebotomíneo vetor de LV positivo para presença de DNA de *Leishmania*. Sendo também registrado a presença de DNA de *Leishmania* em exemplares no ambiente de fazenda.

Para os vetores comprovados de LTA foi registrado positividade para DNA de *Leishmania* nos ambientes de fazenda, caverna e distrito, todos eles próximos a presença de mata nativa. Por apresentar grande parte de sua cobertura vegetal fragmentada e a proximidade desses fragmentos a habitações humanas, o município de Pains, apresenta características favoráveis para o deslocamento e expansão dos flebotomíneos.

A utilização de geotecnologias como o sensoriamento remoto correlacionada a dados ecológicos e epidemiológicos proporciona identificar modificações ambientais, assim como também permitir a visualização da distribuição dos flebotomíneos de uma determinada área, possibilitando delimitar áreas geográficas de potencial risco de transmissão das leishmanioses (CARNEIRO et al., 2004; HUGH-JONES, 1989; MACHAULT et al., 2011).

As estratégias para a prevenção e o controle muitas vezes são pouco eficazes devido à complexidade da doença e perfil epidemiológico específico para região. As informações geradas pelos mapas temáticos servem como auxílio para gestão de saúde, facilitando e direcionando decisões no planejamento de estratégias de intervenção para a prevenção e o controle dessas doenças, delimitando áreas prioritárias para intervenção ambiental e da população que compõe tal território, minimizando custos operacionais do município (CARNEIRO et al., 2004; MACHAULT et al., 2011; BRASIL, 2017, BRASIL, 2010).

Como medidas preventivas utilizadas para reduzir o risco de contato de flebotomíneos com os humanos é sugerido o uso de repelente, proteção de roupa ao adentrar em áreas de mata, remoção da matéria orgânica de quintais e terrenos, limpeza de abrigos de animais domésticos e o uso de colares impregnados por deltametrina em cães (MAIA-ELKHOURY et al., 2018; MARZOCHI et al., 2014).

De acordo com Margonari et. (2012) uma das principais formas de vigilância e prevenção para impedir a expansão geográfica dessa enfermidade é a ampliação do conhecimento da população sobre a doença. Um estudo realizado no município para

avaliar o nível de conhecimento e o risco de exposição da população de Pains, demonstrou um conhecimento fragmentado e presença de fatores de risco em domicílios (MARGONARI et al., 2020). Ressalta-se a importância de se realizar produção de material didático e desenvolver capacitação dos profissionais de saúde para realizar a sensibilização, da população, a fim de se tornarem aliados no processo de prevenção da reprodução e proliferação dos flebotomíneos na região.

Informações sobre a ecologia dos flebotomíneos juntamente com o uso sustentável do solo e a conservação ambiental, podem evitar a proliferação do inseto vetor no município, sendo um dos principais meios de controle à leishmaniose. O cenário epidemiológico das leishmanioses no município de Pains é complexo. Os resultados do estudo evidenciam que todos os ambientes do município apresentam perfil epidemiológico adequados para a transmissão e expansão das leishmanioses em todo o território. Devido a importância de polo econômico do município que resulta em crescentes modificações ambientais, destaca-se a importância da elaboração de estratégias preventivas e de controle adequados para cada ambiente, bem como implementação de medidas de educação em saúde da população, com intuito de minimizar a expansão da doença.

7. CONCLUSÃO

- Foram registradas 24 espécies de flebotomíneos pertencentes a 10 gêneros, distribuídos em sete ecótopos do município de Pains.
- As espécies *Brumptomyia pinto* e *Evandromyia walkeri* foram registradas pela primeira vez no município.
- Foi registrada a presença das espécies *Ev. cortelezzii*, *Ev. edwardsi*, *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* durante todo ano, tanto no período seco quanto chuvoso, sinalizando grande plasticidade e alta importância epidemiológica, destacando o potencial risco de transmissão de *Leishmania* durante todo o ano.
- Os flebotomíneos apresentaram ampla circulação em todo município estando presentes em todos os ecótopos e pontos de coleta.
- As modificações do meio ambiente têm promovido a propagação dos flebotomíneos para ambientes próximos ao contato humano.
- As espécies *Brumptomyia cunhai*, *Evandromyia cortelezzii*, *Nyssomyia whitmani* e *Sciopemyia sordellii* que foram capturadas em todos os ecótopos, demonstrando alta adaptabilidade dessas espécies na região.
- O registro de espécies vetores comprovados e a presença do agente etiológico *Leishmania* sp., em todos os ambientes, desempenha importância para contínua vigilância e manutenção de medidas de controle e prevenção no município.
- A presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos não comprovados vetores, ressalta importância de estudos para elucidar uma possível participação no ciclo de transmissão no município.
- As variáveis climáticas (temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar) medidas não obtiveram correlação significativa com a abundância dos flebotomíneos coletados.
- Ressalta-se no ambiente cavernícola a presença de flebotomíneos vetores e a segunda maior abundância de insetos infectados naturalmente, uma vez que município de Pains possui grande potencial para turismo ecológico e sofre com as atividades mineradoras que interferem nesse ambiente.
- O ambiente de plantação de eucalipto apesar de ser o segundo ecótopo com maior abundância, obteve registro de sete espécies com apenas um exemplar coletado.

- A técnica de geoprocessamento auxilia em medidas de vigilância a serem mais direcionadas e acompanharem a dinâmica dos flebotomíneos na região.
- A conservação da biodiversidade atua impedindo a expansão das leishmanioses e o ambiente de mata na manutenção dos flebotomíneos.
- Reitere-se que o presente estudo auxilia na compreensão do perfil epidemiológico, demonstrando que o município de Pains compreende características propícias para expansão das leishmanioses e sua urbanização.
- A predominância de flebotomíneos nos ecótopos de mata, caverna e fazenda se deve, possivelmente, a maior disponibilidade de fonte alimentar.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M. et al. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro: IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 465-482, 1985.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In E.F. Rangel & R. Lainson (orgs.), **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, p.207-255, 2003.
- AKHOUNDI, M. et al. 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.
- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.
- ALEXANDRE, J. et al. Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.
- ALVAR, J. et al. *Leishmaniasis* worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7 n. 5: e35671, 2012.
- ALVES, G. B. et al. Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 437-443, 2012.
- ALVES, J. R. C. et al. Ecological aspects of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) of Sumidouro District, State of Rio de Janeiro, Brazil. **bioRxiv**, 2020.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, p. 32-46, 2001.
- ANDRADE FILHO, J. D. et al. Sand flies in Timóteo, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, n. 4, p. 767-770, 1997.

ANDRADE FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 481-487, 2007.

ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. A new species of *Evandromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Minas Gerais State, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 3, p. 445-450, 2012.

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.

ARAUJO V. E. M. et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban área. **Plos Neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1: e2540, 2013.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

Azevedo, A. C., Rangel, E. F., & Queiroz, R. G. (1990). *Lutzomyia migonei* (Franca, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(4).

BANDUCCI JÚNIOR, A.; LOBO, H. A. S.; Turismo em caverna e as representações do mundo subterrâneo. **Revista de Turismo y Patrimônio Cultural**, Tenerife-Espanha, v.43, n. 5, p. 585-594. 2012.

BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38. p. 421–42. 2005.

BARATA, R. A. et al. Controle da leishmaniose visceral no município de Porteirinha, estado de Minas Gerais, no período de 1998 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 386-388, 2011.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sandflies in Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, Minas Gerais state, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 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**, v. 107, n. 8, p. 1016-1020, 2012.

BARBOSA, D. S. et al. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 131, p. 56-62, 2014.

BARCELLOS, C.; BASTOS, F. I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, p. 389-397, 1996.

BARRETO, M. B. Pesquisa de *Leishmania* por meio de reação em cadeia da polimerase e identificação de espécies da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)** - Universidade de Brasília, Brasília, 71p., 2011.

BARRETTO, M. P. Observações sobre a Biologia, em Condições Naturais, dos Flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). São Paulo: **Tipografia Rossolillo**, 1943.

BARRIOS, S. P. G. et al. Synanthropy and diversity of Phlebotominae in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in the South Pantanal floodplain, Midwest Brazil. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0215741, 2019.

BOYLES, J. G. et al. Economic importance of bats in agriculture. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 41-42, 2011.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Abordagens espaciais na Saúde Pública**. Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2010.

BRAZIL, R. P. et al. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitologia**, v. 33, p. 113-117, 1991.

BRAZIL, R. P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 263-264, 2013.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 1, 2015.

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

BRUHN, F. R. P. et al. Spatial and temporal relationships between human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006-2013. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2018.

BUENO, M. Classificação de Áreas de Transmissão da Leishmaniose Visceral no Estado de Minas Gerais - 2020. **Portal da vigilância em saúde**. Disponível em: <<http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/classificacao-de-areas-de-transmissao-da-leishmaniose-visceral-no-estado-de-minas-gerais-2020/>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2021.

CÂMARA, G.; DAVIS, C.; MONTEIRO, A. M. V. Introdução a Ciência da Geoinformação. **INPE**, 2001.

CAMPELLO, M. S. Rochas carbonáticas.

CAMPOS, A. M. et al. Photoperiod differences in sand fly (Diptera: Psychodidae) species richness and abundance in caves in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 1, p. 100-105, 2017.

CAMPOS, A. M. et al. Species composition of sand flies (Diptera: Psychodidae) in caves of Quadrilátero Ferrífero, state of Minas Gerais, Brazil. **PloS one**, v. 15, n. 3, p. e0220268, 2020.

CANIE, Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas. **Relatório estatístico - CANIE**. 2020.

CARDOSO, D. T. et al. Identification of priority areas for surveillance of cutaneous leishmaniasis using spatial analysis approaches in Southeastern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2019.

CARDOSO, P.; RIGAL, F.; CARVALHO, J. C. BAT - Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 232-236, 2015.

CARNEIRO, D. D. M. T. Identificação de áreas de risco para a leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (2000-2002). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 28, n. 1, p. 19-19, 2004.

CARVALHO, G. M. L. et al. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 6, p. 972-976, 2014.

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

CASANOVA, C.; COSTA, A. I. P.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly Lutzomyia neivai (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 719-724, Nov., 2005.

CASTELO, N. O. et al. Fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) em parques do Município de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, p. 1-9, 2015.

CASTRO, L. S. et al. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 11, p. 261-267, 2020.

CECAV, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas. **Relatório Anual do CECAV**, 2020.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. O Geoprocessamento e Saúde Pública. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 4, p. 01-02, 2017.

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

CONFALONIERI, U. E. C.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta tropica**, v. 129, p. 33-41, 2014.

COSTA, J. C. R. et al. First molecular evidence of frogs as a food source for sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Brazilian caves. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1571-1582, 2021.

COSTA, W. A.; SOUZA, N. A. Sand Flies: Medical Importance. In: **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham, p. 1-8, 2018.

COUTINHO, J. O. Localização de formas em leptomonas, possivelmente de *Leishmania brasiliensis*, na faringe de *Phlebotomus pessoai* naturalmente infectado An. **Fac. Med. S. Paulo**, v. 16, p. 163-71, 1940.

DAJOZ, R. **Ecologia geral**. 4ª. ed. Petrópolis, Vozes. 472p.1983.

D'ANDREA, L. A. Z., GUIMARÃES, R.B. A importância da análise de distribuição espacial da leishmaniose visceral humana e canina para as ações de vigilância em saúde. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 14, n. 28, p. 121-138, 2018.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DATASUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. **Casos de LTA**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 8 de novembro de 2020.

DATASUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. **Casos de LV**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def>>. Acesso em: 8 de novembro de 2020.

DE AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Regional distribution and habitats of Brazilian phlebotomine species. **Brazilian sand flies**. Springer, Cham. p. 251-298, 2018.

DE CASTRO FERREIRA, E. et al. *Leishmania* (V.) *braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: First records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. **Acta tropica**, v. 172, p. 217-222, 2017.

DE CASTRO SANGUINETTO, E.; DE OLIVEIRA DANIEL, G.; FERREIRA, M. D. Inclusão de áreas de proteção permanente em feições cársticas do município de Pains, MG. **Caderno Prudentino de Geografia**, v. 1, n. 40, p. 68-92, 2018.

DE FREITAS, C. R. O papel e a importância do microclima das cavernas no uso e gestão sustentável de cavernas-espetáculo. **Acta Carsológica**, v. 39, n. 3, 2010.

DE LIMA CARVALHO, G. M. et al. Ecological aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambuí, Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77158, 2013.

DE REZENDE, M. B. et al. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, n. 6, p. e36-e42, 2017.

DEANE, L. M. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 3, 1962.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios transmissores realizados no estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, Rio de Janeiro, 1956.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clin Dermatol.** v. 14, n. 5, p. 417-23, 1996.

DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 49-52, Feb, 2007.

DIAS-LIMA, A. G.; GUEDES, M. L. S.; SHERLOCK, I. A. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

DIAS-SVERSUTTI, A. C. et al. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the state of Paraná, South Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 953-959, 2007.

DINIZ, M. M. C. S. L., OVALLOS, F. G., DE CASTRO GOMES, C.M. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

DORVAL, M. E. C. et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 104, n. 5, p. 695-702, 2009.

DOS REIS, R. J. et al. Análise espacial do período chuvoso em Minas Gerais. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA APLICADA, 11., 2005, São Paulo. Geografia, tecnociência, sociedade e natureza: anais. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

DOUINE, Maylis et al. Illegal gold miners in French Guiana: a neglected population with poor health. **BMC public health**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

DUCHARME, O. et al. *Leishmania naiffi* and *lainsoni* in French Guiana: Clinical features and phylogenetic variability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008380, 2020.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.

FARIA, M. T. et al. Autochthonous case of Canine Visceral Leishmaniasis in a non-endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 12, p. 1505-1508, 2017.

FELICIANGELI, M. D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela: II. Species composition in relation to habitat, catching method and hour of catching. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 125-131, 1987.

FIGUEIREDO, A. B. F. et al. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, n.10, e00093516, 2017.

FORATTINI, O. P. et al. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 6, p. 431-433, 1972.

FRANKE, C. R. et al. Impact of El Niño/southern oscillation on visceral Leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 914, 2002.

GALATI, E. A. B. et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Ribeira Valley Speleological Province - 1. Parque Estadual Intervales, state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. entomol.** São Paulo, v. 54, n. 2, p. 311-321, 2010.

GALATI, E. A. B. et al. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 2, p. 283-296, 2003.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia. Classificação de Phlebotominae. EF. Rangel, R. Lainson (org.), 1st ed., **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23–51, 2003.

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, 2019.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C. et al. Leishmania infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1980, 2017.

GONCALVES, A. F. L. S. et al. Spatial dynamics and socioeconomic factors correlated with American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil from 2008 to 2017. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 53, e20190373, 2020.

GONTIJO, C. M. F. et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 143-150, 2002.

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

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

GUIMARAES, V. C. F. V. et al. Molecular detection of leishmania in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 357-360, 2014.

GUIMARÃES, V.C.F.V, PRUZINOVA, K., SADLOVA, J. et al. *Lutzomyia migonei* é um vetor permissivo competente para *Leishmania infantum*. **Parasites Vectors**. v.9, n.159 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>

HUGH-JONES, M. Applications of remote sensing to the identification of the habitats of parasites and disease vectors. **Parasitol Today**, 1989.

IBGE. População de Pains. Disponível em:

<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/pains/panorama>>. Acesso em: 20 de julho de 2020.

IBRAM. Panorama da Mineração em Minas Gerais. Instituto Brasileiro de Mineração, Sindicato Nacional da Indústria da Extração do Ferro de Metais – Brasília, 2015.

KEESING, F. et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647-652, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie humaine et comparée**, v. 65, p. 37-42, 1990.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. **Ann N Y Acad Sci**, v.1223, p.1-38, 2011.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAMOUNIER, V. V. et al. Análise da leishmaniose visceral canina e humana no município de Cláudio, Macrorregional de Saúde Oeste de Minas Gerais, Brasil. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 16, p. 220-231, 2020.

LAMOUNIER, V. V. et al. Leishmaniose visceral canina autóctone em área indene no Centro Oeste de Minas Gerais, Brasil. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 3, p. 179-184, 2017.

LANA, R. S. et al. Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0206452, 2018.

LANA, R. S. et al. Phlebotomine sand fly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

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

LEITE, J. A. Fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios na área urbana de nova Andradina-MS e infecção natural por *Leishmania*. **Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)**. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2015.

LIMA, B. S. et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 9, p. 592-597, 2013.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 581-585, 2007.

LUZ, A. B.; LINS, F. A. F. **Rochas & Minerais Industriais – Usos e Especificações**. Centro de Tecnologia Mineral, Ministério da Ciência e Tecnologia, Rio de Janeiro, 2ª ed., 974p. ISBN: 9788561121372, 2008.

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

MACHADO DA SILVA, A. V. et al. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. **Geospatial Health**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2011.

MACHADO, C. A. L. et al. Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: A cross-sectional study. **Acta tropica**, v. 208, p. 105520, 2020.

MACHADO-COELHO, G. L. et al. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. **International journal of epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 982-989, 1999.

MACHAULT, V. et al. The use of remotely sensed environmental data in the study of malaria. **Geospat Health**, v. 5, p.151-168, 2011.

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

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALBUQUERQUE, R.; SALOMÓN, O. D. Leishmaniasis-Vector Surveillance and Control in Brazil: A Challenge to Control Programs. **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham, p. 467-494, 2018.0

MARCHI, M. N. A. et al. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 61, e68, 2019.

MARCONDES, C. B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotomidae) of the world. **Entomol. News**, v.118. p. 351-356. 2007.

MARCONDES, C. B. et al. 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.

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

MARGONARI, C. et al. Level of Knowledge and Risk Factors for Visceral Leishmaniasis in a Mining Area of Minas Gerais State, Brazil. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2020, 2020.

MARGONARI, C. et al. Phlebotomine Sand Flies (Díptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, l. 6, 1, p. 1212–1219, 2014.

MARGONARI, C. et al. Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. **Journal of tropical medicine**, 2012.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARSELLA, R.; DE GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. **International journal of dermatology**, v. 37, n. 11, p. 801-814, 1998.

MARZOCHI, M. C. A. et al. A questão do controle das leishmanioses no Brasil. **Leishmanioses do continente americano**, p. 431-463, 2014.

MASSAFERA, R. et al. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no Estado do Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 571-577, 2005.

MASTER GAIA. Plano de Manejo Parque Natural Municipal Dona Ziza. Belo Horizonte. 2015.

MEDRONHO, R. A. Epidemiologia. Distribuição das doenças no espaço e no tempo. Medronho RA. & Perez MA. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

MELCHIOR, L. A. K.; BRILHANTE, A. F.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Spatial and temporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazil. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2017.

MENEZES, J. A. et al. An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

MENEZES, J. A. et al. Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, p. 362-374, 2016.

MHADHBI, M.; SASSI, A. Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. **Equine veterinary journal**, v. 52, n. 1, p. 28-33, 2020.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**. p. 232-246, 2019.

MONTIRA, P. J. et al. Biodiversity loss affects global disease ecology. **Bioscience**, v. 59, n. 11, p. 945-954, 2009.

MOYA, S. L. et al. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica**, v. 152, p. 181-184, 2015.

MUNIZ, L. H. G. et al. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1087-1093, 2006.

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

NASCIMENTO, B. W. L. et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state—Brazil. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 262-268, 2013.

OLIVEIRA, A. G. de et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 933-944, 2003.

OLIVEIRA, C. D. L. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, F. S. et al. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 219-227, 2005.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, Washington, D.C., 2020

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 10, p. 925-932, 2016.

OSTFELD, R. S. Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 40-43, 2009.

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

PATZ, J. A. et al. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1092-1098, 2004.

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

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

PEREIRA, N. C. L. Ecologia de flebotomíneos em área de transmissão de leishmanioses no município de Itaúna, Minas Gerais. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz**. Belo Horizonte, 2019.

PESSOA, S. B., COUTINHO, J. O. Infecção Natural do *Phlebotomus pessoai* por Formas em Leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. **Rev. Biol. Hig.**; v. 10: p.139- 142,1940.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em entomologia molecular. Cap**, v. 12, p. 1-45, 2012.

PINHEIRO, A. C. et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, Brazil, between 2008 and 2012. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

PINHEIRO, M. P. G. et al. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, n. 2, p. 307-316, 2013.

PITA-PEREIRA, D. et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

PODANI, J.; SCHMERA, D. A new conceptual and methodological framework for exploring and explaining pattern in presence–absence data. **Oikos**, v. 120, n. 11, p. 1625-1638, 2011.

POULSON, T. L.; WHITE, William B. The cave environment. **Science**, v. 165, n. 3897, p. 971-981, 1969.

PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.

PUGEDO, H. et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

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

QUARESMA, P. F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

QUEIROZ, R. G. et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in baturite municipality. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 50, n. 6, p. 693-698, 1994.

QUINTANA, M. G. et al. Multiscale environmental determinants of *Leishmania* vectors in the urban-rural context. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.** Available at <http://www.R-project.org>.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RANGEL, Elizabeth F. et al. Environmental changes and the geographic spreading of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Leishmaniasis—trends in epidemiology, diagnosis and treatment**. InTech, Rijeka, p. 1-25, 2014.

RANGEL, Elizabeth F. et al. Sand fly vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: **Brazilian sand flies**. Springer, Cham. p. 341-380, 2018.

READY, P. D.; VIGODER, F. M.; RANGEL, E. F. Molecular and Biochemical Markers for Investigating the Vectorial Roles of Brazilian Sand Flies. **Brazilian Sand Flies**, p. 213-250, 2018.

RÊGO, F. D. et al. Ecological aspects of the phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.

RÊGO, F. D. et al. Molecular detection of *Leishmania* in Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS One**; v. 10, p. 1-14, 2015

RÊGO, F. D. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 2013.** 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013.

REITHINGER R, Davies C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am J Trop Med Hyg.** v.61, n.4, p530-41, 1999. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.530. PMID: 10548285.

ROCHA, L. C.; LOROSA, N. E. S.; FRANCO, A. M. R. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 571-574, 2004.

RODRIGUES, A. A. F. et al. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 943-946, 2013.

RODRIGUES, M. G. A. et al. The role of deforestation on American cutaneous leishmaniasis incidence: spatial-temporal distribution, environmental and socioeconomic factors associated in the Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 3, p. 348-355, 2019.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos Ciclos de Transmissão nos ambientes silvestre e Sinantrópico. **Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmanioses do continente americano.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 233-57, 2014.

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

ROSÁRIO, I. N. G. et al. Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 2, p. 450-459, 2017.

SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, v. 113, n. 1, p. 84-87, 2010.

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

SANGUINETTE, C. C. **Epidemiologia das leishmanioses no distrito de Barra do Guaicui, município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.

SANGUINETTE, C. C. **Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: Estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2011.

SANTOS, A. F. A. et al. Capacidade de retenção hídrica do estoque de serapilheira de eucalipto. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

SARAIVA, L. et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1159-1163, 2009.

SARAIVA, L. et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. **Acta Tropica**, v. 117, n. 2, p. 137-145, 2011.

SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033-1039, 2010.

SHAPIRO, J. T. et al. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta tropica**, v. 128, n. 1, p. 171-174, 2013.

SHERLOCK, I. A. Importância médico veterinária. **EF Rangel, R Lainson R (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro**, p. 15-22, 2003.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE 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.

SILVA, D. F. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses no município de Pains, Centro Oeste Mineiro. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte**, 2019.

SILVA, R. B. S. et al. Spatial analysis of canine leishmaniasis in an area of transmission of the semi-arid region of the State of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, 2021.

SOARES, I. R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 665-669, 2013.

SOUZA, C. F. **Studies of sandflies urbanization and epidemiological aspects of American leishmaniasis cutaneous in the municipality of Timóteo, Minas Gerais, Brazil**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology research**, v. 97, n. 3, p. 247-254, 2005.

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

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 137-138, 2005.

TEIXEIRA NETO, R. G. **Análise espacial das leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil**. Tese (Doutorado Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2014.

TEIXEIRA NETO, RG, da Silva, ES, Nascimento, RA *et al.* Leishmaniose visceral canina em um ambiente urbano do sudeste do Brasil: um estudo ecológico envolvendo análise espacial. *Parasites Vectors* v. 7, 485, 2014.

TEIXEIRA, P. S.; DIAS, M. S. Levantamento espeleológico da região cárstica de Arcos, Pains, Doresópolis, Córrego Fundo e Iguatama, frente às atividades degradadoras. **Congresso brasileiro de espeleologia**, 2003.

TEODORO, L. M. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from iron ore caves in the State of Pará, Brazil. **Subterranean Biology**, v. 37, p. 27, 2021.

TEODORO, L.M. Biodiversidade e aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) provenientes de cavernas brasileiras. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**, Universidade Federal dos Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 59p., 2019.

TIMO, M. B. **Mapeamento geomorfológico da região cárstica do Córrego do Cavallo, Piumhi (MG)**. Dissertação – Mestrado em Geografia, Programa de Pós-Graduação em Geografia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 133p., 2014.

TOLEDO, C. R. S. et al. Vulnerability to the transmission of human visceral leishmaniasis in a Brazilian urban area. **Revista de saúde pública**, v. 51, p. 49, 2017.

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

TONELLI, G. B. et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0190315, 2017.

TRAVI, B. L. et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 275-278, 1998.

URSINE, R. L. et al. American Tegumentary Leishmaniasis in an endemic municipality in the North of Minas Gerais State: spatial analysis and socio-environmental factors. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 63, e2, 2021.

VALDERRAMA, A.; TAVARES, M. G.; ANDRADE FILHO, J. D. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1024-1031, 2011.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology research**, v. 119, n. 2, p. 365-384, 2020.

VIEIRA, V. R. **Estudo sobre a ecologia dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em ambientes de grande ação antrópica e silvestre, da orla marítima dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil.** Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

WERNECK, G. L. et al. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology**, v. 13, n. 3, p. 364-367, 2002.

WHO. Weekly epidemiological record, No 25.;v.95;p.265–280. 2020 Available from: <file:///C:/Users/hchoi/Downloads/WER9525-eng-fre.pdf>.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1; acessado em 10 de dezembro de 2020.

ANEXO 1 – Licença permanente para coleta de material zoológico



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

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

Dados do titular

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

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente NÃO exige do pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exige do pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Psychodidae
2		

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 36646273



Página 1/2

