

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Doutorado**

**ECOLOGIA E VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETORES DE *LEISHMANIA* SPP., NOS  
LIMITES DA SEDE DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS,  
CACHOEIRAS DE MACACU, RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL.**

**Thamiris D’Almeida Balthazar**

**Rio de Janeiro  
Agosto de 2022**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Thamiris D’Almeida Balthazar**

**ECOLOGIA E VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETORES DE *LEISHMANIA* SPP., NOS  
LIMITES DA SEDE DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS,  
CACHOEIRAS DE MACACU, RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutora em Ciências

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Vilela**

**Co-Orientadora: Prof. Dra. Jacenir Mallet**

**RIO DE JANEIRO**

**Agosto de 2022**

D'Almeida Balthazar, Thamiris.

Ecologia e vigilância entomológica de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), vetores de *Leishmania spp.*, nos limites da sede do parque estadual dos três picos, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro - RJ, Brasil. / Thamiris D'Almeida Balthazar. - Rio de Janeiro, 2022.

xv, 96 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientador: Maurício Luiz Vilela.

Orientadora: Jacenir Reis dos Santos Mallet.

Bibliografia: f. 74-82

1. Leishmanioses Tegumentar Americana. 2. Flebotomíneos. 3. Bioecologia. I. Título.


Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.

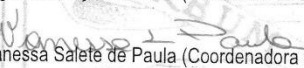


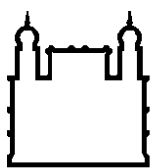
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Medicina Tropical de **Thamiris D' Almeida Balthazar**, sob orientação do Dr. Maurício Luiz Vilela e Dr<sup>a</sup>. Jacenir Reis dos Santos Mallet. Ao trigésimo dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: "**Ecologia e vigilância entomológica de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), vetores de *Leishmania* spp., nos limites da sede do Parque Estadual dos Três Picos, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – RJ**", no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Cleber Galvão Ferreira – IOC/FIOCRUZ, Dr. Andrey José de Andrade – UFPR/PR, e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues- IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Maria Regiane Araújo Soares - UFPI/PI. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2022.

  
Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (Presidente da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**AUTORA:** Thamiris D'Almeida Balthazar

**ECOLOGIA E VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETORES DE *LEISHMANIA* SPP., NOS  
LIMITES DA SEDE DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS,  
CACHOEIRAS DE MACACU, RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL.**

**ORIENTADORES:** Prof. Dr. Maurício Vilela

Prof. Dra. Jacenir Mallet

**APROVADA EM:** 30 / 08 / 2022

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Reginaldo Peçanha Brazil

Presidente (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** Cleber Galvão Ferreira

Membro interno (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** Andrey José de Andrade

Membro Externo (UFPR/PR)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues

Suplente interno (IOC/FIOCRUZ)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Maria Regiane Araújo Soares

Suplente Externo (UFPI/PI)

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2022

“Aqueles que passam por nós, não vão sós,  
não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,  
levam um pouco de nós.”

SAINT-EXUPÉRY, A., 1987.

## **Agradecimentos**

Gratidão ao universo, à Deus, Oxalá e todos os meus guias e amigos espirituais por chegar até aqui. Sem minha fé e meu propósito de que independente dos obstáculos que encontrasse no caminho tudo daria certo, nada disso seria possível. Sou grata por estarem comigo me mantendo forte e de bom coração para contribuir com a saúde pública.

Gratidão àqueles que não soltaram minha mão e comemoraram cada pequeno passo dessa minha caminhada. Em especial, meus Pais Therezinha e Ricardo por toda dedicação, amor e carinho ao longo de toda minha vida, meu irmão Renan que sempre falou com orgulho que tem uma irmã nerd, meus tios Raquel, Jorge, Roberto e Rose que vibraram em cada etapa, meus primos Letícia, Maria Eduarda e Enzo que me olham como exemplo, minha tia Cristiane Fiori que muito me inspira na biologia, e, mais especial ainda, minha avó Lisete que não só me incentiva, mas me inspira com toda sua força mantendo nossa família unida e se amando onde quer que estejamos. E ao meu companheiro-amigo-Amor André, que chegou nessa reta final de escritas, mas foi fundamental nas conversas me ajudando a manter meu foco nos planos futuros da carreira.

*In memoriam* àqueles que de outro plano espiritual ainda caminham ao meu lado e com certeza estão comemorando comigo mais essa etapa, meu avô Roberto e minha Bisa Altair.

À minha equipe que virou família LIVEDIH, em especial aos meus orientadores, os melhores do mundo, Maurício Vilela que me fez acreditar que eu era capaz de fazer esse projeto incrível e Jacenir Mallet que sempre me fez acreditar que eu era capaz de conquistar o mundo, gratidão é pouco para descrever o tanto que vocês foram incríveis e especiais na minha vida.

Ao meu time de ouro Alexandre Oliveira, William Almeida e técnico Luiz Costa que nunca me abandonaram nas missões de campo; ao técnico Antônio Santana que sempre esteve disposto a ajudar nas intermináveis lâminas difíceis e por todo papo e troca de experiências nesses anos; Amiga Bruna Queiroz que mesmo na outra ponta do Brasil sempre estivemos juntas; À Margarete Afonso e Wagner Costa por nossas conversas sobre educação em saúde e toda ajuda que me deram até aqui; À Dra Elizabeth Rangel por todo conhecimento e legado no nosso laboratório onde muito aprendi.

Agradeço ainda aos membros da equipe do LIVEDIH Simone Teves, Simone Costa, Raquel, Bruna, Dra Catarina Macedo (estendo esse agradecimento ao seu marido e companheiro professor Rubens), Dra Tereza Cristina e Renato Junior, pelas ajudas, conversas e conselhos ao longo da minha jornada. E aos meus “filhos científicos” que de alguma forma passaram pelo meu caminho e me formaram como também orientadora, cada um de vocês foi de suma importância na minha formação: Lorena, Ana Beatriz, Ana Luiza, Caroline, Ana Paula, Rose, Camila e Samantha.

Agradeço à imensa colaboração do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas nos estudos moleculares desta tese, em especial à Dra Constança Brito por me receber sempre com muito carinho, Dra Daniella Pita-Pereira que além de uma grande professora de todas as técnicas moleculares do meu estudo se tornou acima de tudo uma grande amiga que terei o prazer de levar para minha vida, Dra Thais Pereira que muito me ajudou nas análises sempre com muita doçura e carinho e à Sandylere Gomes que muito me ajudou também com as análises.

Aos Colaboradores que direta ou indiretamente me ajudaram a pensar em muitas possibilidades dentro deste projeto e para além deste. Agradeço ao Professor Ronaldo Figueiró pelas conversas sobre análises ambientais. À professora Nena Bergalo, por me acompanhar nos campos finais pensando em mais projetos futuros, obrigada pelos dias agradáveis de campo, risadas e muito conhecimento. E estendo o agradecimento aos seus alunos Atila Ferreguetti, Marcinha e James por toda troca.

À toda rede de apoio e predial do pavilhão Carlos Chagas pelo carinho, conversas e cafés da tarde, em especial Jô, Ligia, Val, Alessandro e Dani.

Aos meus amigos da pós que desde o mestrado me acompanham e fizeram dessa jornada um pouco mais leve e prazerosa. Nathalia Alves, que me presenteou nesse caminho com uma princesa da Titia, Júlia; Arthur Alves por ser mais que um representante suplente, sendo meu amigo em todas as horas; toda equipe de representantes discentes Anne, Maria Clara, Andreon, Darwin e Brenda sem vocês eu não seria uma representante titular com tantos êxitos. E aos representantes discentes das demais pós do IOC e os representantes gerais do IOC, os quais formamos muito mais que um grupo de representação, mas uma rede de apoio e muitas parcerias, em especial meu grande amigo João Paulo, por me incentivar desde o começo e ser meu grande amigo de muitos risos e desabafos.



À toda CPG que sempre me escutou, aconselhou e me ensinou muito durante meus 4 anos na representação. Em especial à Dra Martha Muthis e Dra Vanessa de Paula como coordenadoras que fizeram muita diferença na profissional que sou hoje. E à secretária e amiga Lívia Mageon por todo suporte e apoio, mas principalmente por sua amizade leal e sincera.

E agradeço à minha banca de avaliação, que escolhemos com todo carinho e admiração. Cada um escolhido teve influência na minha formação seja pessoal ou referencial teórico. Profissionais que muito admiro e me espelho.

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

Gratidão.

## Índice:

1.	Introdução:.....	1
1.1	A Leishmaniose tegumentar americana e seus vetores:.....	5
1.2	Bioecologia de Phlebotominae .....	6
1.3	Influência das fases da lua na biologia de Phlebotominae: .....	8
1.4	Situação epidemiológica e distribuição entomológica do Rio de Janeiro:.....	9
1.5	O Parque Estadual dos Três Picos: .....	10
2.	Justificativa:.....	14
3.	OBJETIVOS:.....	15
	Objetivo Geral: .....	15
	Objetivos específicos:.....	15
4.	Material e métodos:.....	16
4.1	Revisão Bibliográfica sobre os Flebotomíneos no estado do Rio de Janeiro: .....	16
4.2	Levantamento da fauna de flebotomíneos do PETP:.....	16
4.3	Captura dos espécimes: .....	17
4.4	Processamento dos espécimes: .....	21
4.5	(59)Diagnóstico das espécies: .....	23
4.6	Análises moleculares:.....	24
	Presença de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em fêmeas de flebotomíneos.....	24
	Análise Estatística.....	26
	Para comparar o número total de flebotomíneos capturados nas diferentes fases da lua também utilizamos o software DivEs - Diversidade de Espécies DE4, e os dados analisados através do índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H) e o índice de Riqueza da Espécies (J) (66). Foi realizado também uma correlação da proporção de machos e fêmeas capturados nas fases lunares, bem como foi realizado uma estatística descritiva utilizando o programa Excel.Mapas Temáticos: .....	30
	Os flebotomíneos do Parque Estadual dos Três Picos. ....	36
	Avaliação da diversidade de flebotomíneos: .....	44
	Avaliação da influência da fase lunar na coleta de flebotomíneos:.....	50
	Avaliação do hábito alimentar e presença de DNA de <i>Leishmania</i> spp. Em flebotomíneos:	
	54	
	Atividades de educação em saúde realizadas no Parque Estadual dos Três Picos, Cachoeiras de Macacu – RJ, Brasil. ....	59
5.	Discussão:.....	64
	Os flebotomíneos do Parque Estadual dos Três Picos: .....	64
	Avaliação da diversidade de flebotomíneos: .....	66

Avaliação da influência da fase lunar na coleta de flebotomíneos:.....	67
Avaliação do hábito alimentar e presença de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos: 69	
6. Conclusão: .....	72
7. Referências:.....	74
9. Anexos:.....	83

## Índice de Figuras:

Figura 1 Ciclo da leishmania spp. usando o homem como modelo de hospedeiro veterebrado. Fonte: Center of Disease Control(CDC). Traduzido por Thamiris Balthazar. 3	
Figura 2 Ciclo da família phlebotominae, representando as fases de ovo, quatro estádios larval, uma fase pupal e adulto, montado a partir da descrição do ciclo descrita por forattini, 1924(8). Montagem do ciclo realizada pela autora Thamiris Balthazar e imagens de Maurício Vilela cedidas pelo Laboratório interdisciplinar de Vigilância Entomológica em diptera e hemiptera – LIVEDIH. .... 7	7
Figura 3 Mapa da área da Sede do Jequitibá do Parque Estadual dos Três Picos apontando as residências em seu interior (marcadas em vermelho) e a sede do parque (marcada em Amarelo). Fonte: Acervo próprio, gerado a partir do software Qgis ..... 13	13
Figura 4 Mapa localizando as estações de monitoramento demarcadas no Parque Estadual dos Três Picos..... 18	18
Figura 5 Estações de Monitoramento demarcadas no limite da sede do Parque Estadual dos Três Picos, onde foram realizado as coletas mensais de flebotomíneos. A: CDC instalada na Estação de Monitoramento 1; B: CDC instalada na Estação de Monitoramento 2; C: CDC instalada na Estação de Monitoramento 3; D: CDC instalada na Estação de Monitoramento 4; E: CDC instalada na Estação de Monitoramento 5. ... 20	20
Figura 6 Fluxograma apresentando o processamento dos espécimes de cada ano..... 22	22
Figura 7 Processamento de Flebotomíneos onde A: placa de cultura de células exemplificando o processo de clarificação e diafanização; B: Cabeça e dois últimos segmentos da fêmea de flebotomíneo montado em Lâmina; B: Macho de flebotomíneo montado em Lâmina. .... 23	23
Figura 8 Fluxograma das avaliações realizadas com os espécimes coletados me cada ano. .... 27	27
Figura 9 Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana distribuídos no estado do Rio de Janeiro durante o período de 2015 a 2020, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)..... 33	33
Figura 10 Distribuição das espécies vetoras de <i>Leishmania braziliensis</i> : <i>Nyssomyia whitmani</i> , <i>Nyssomyia intermedia</i> , <i>Migonemyia migonei</i> e <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> ; e espécies suspeitas de serem vetoras de <i>Leishmania braziliensis</i> : <i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> e <i>Pintomyia fisheri</i> correlacionado com a distribuição de casos de LTA no estado do Rio de Janeiro ..... 35	35

Figura 11 dados preliminares DA distribuição das espécies DE FLEBOTOMÍNEOS capturadas no período de agosto, setembro e novembro de 2017, na sede do Jequitibá do Parque Estadual dos Três Picos. ....	36
Figura 12 Distribuição dos espécimes capturados nos Gêneros identificados durante o período de Janeiro a Dezembro de 2019. ....	37
Figura 13 Distribuição dos espécimes capturados nas Espécies capturadas e identificadas durante o período de Janeiro a Dezembro de 2019, destacando-se a porcentagem das espécies de interesse à saúde Pública. ....	38
Figura 14 espécies de importância médica capturadas no Parque Estadual dos Três Picos no período de Janeiro a Dezembro de 2019. ....	39
Figura 15 Curvas da riqueza de espécies estimada, sendo “a” da estação chuvosa, “c” da estação seca e “e” representando o total do estudo. e curvas de rarefação que representam a riqueza de espécies observada de flebotomos capturados no Parque Estadual dos Três Picos, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – rj, brasil, de janeiro a dezembro de 2019, com intervalo de confiança de 95%, considerando o mesmo tamanho de amostra. sendo “b” para estação chuvosa, “d” para estação seca e “f” representando o total do estudo. ....	40
Figura 16 Distribuição das espécies identificadas no Parque Estadual dos Três Picos nos meses que fazem parte do período seco do ano de 2019, associados aos índices pluviométricos, de temperatura e de umidade. ....	41
Figura 17 Distribuição das espécies identificadas no Parque Estadual dos Três Picos nos meses que fazem parte do período chuvoso do ano de 2019, associados aos índices pluviométricos, de temperatura e de umidade. ....	42
Figura 18 Mapa temático georreferenciado do período chuvoso, compreendendo o período de os meses de janeiro, fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro, com a marcação das estações de monitoramento EM1 (Trilha da entrada); EM2 (Trilha dos Cristais); EM3 (Trilha do Jequitibá); EM4 (Trilha dos bichos); EM5 (Trilha das águas). ....	45
Figura 19 Mapa temático georreferenciado do período seco, compreendendo o período de os meses de março até agosto, com a marcação das estações de monitoramento EM1 (Trilha da entrada); EM2 (Trilha dos Cristais); EM3 (Trilha do Jequitibá); EM4 (Trilha dos bichos); EM5 (Trilha das águas). ....	46
Figura 20 gráficos apresentando os dados estatísticos do período chuvoso de: (A) diversidade de Shannon-Wiener; (B) Dominância de Simpson; (C) Equidade; (D) Riqueza de Jackknife (1ª ordem) ....	47

Figura 21 gráficos apresentando os dados estatísticos do período seco de: (A) diversidade de Shannon-Wiener; (B) Dominância de Simpson; (C) Equidade; (D) Riqueza de Jackknife (1ª ordem).....	49
Figura 22 Padrão de distribuição de flebotomíneos nos períodos de fase da Lua, onde A: distribuição em % por fase da lua; B: Densidade de machos e fêmeas na lua crescente; C: Densidade de machos e fêmeas na lua cheia; D: Densidade de machos e fêmeas na lua minguante; E: Densidade de machos e fêmeas na lua nova. ....	50
Figura 23 Comparação da distribuição nas fases de lua das espécies separadas por macho e fêmea, onde a cor azul representa os machos e a cor vermelha representa as fêmeas. Sendo o gráfico (A) a representação da lua crescente, seguido do gráfico (B) representando a lua cheia; O gráfico (C) a representação da lua minguante; e no gráfico (D) a representação da lua nova. ....	52
Figura 24 gráficos apresentando os dados estatísticos das fases da lua onde o gráfico (A) representa a Dominância de Simpson; (B) diversidade de Shannon-Wiener; (C) Riqueza de Jackknife (1ª ordem) .....	53
Figura 25 Gel de Agarose apontando a amplificação do KDNA na região de 120pb no poço 5 da amostra, representando assim a amplificação de <i>Leishmania</i> spp. Sendo M: Marcador de peso Molecular, CN: controle Negativo, CM: controle Macho e pb: Pares de Base .....	57
Figura 26 Gel de Agarose apontando a amplificação do KDNA na região de 120pb no poço 5 da amostra, representando assim a amplificação de <i>Leishmania</i> spp. Sendo a primeira coluna Marcador de peso Molecular, a segunda apresenta o controle Negativo, a terceira o controle Macho e as demais, cada coluna representa uma fêmea. pb: Pares de Base .....	58
Figura 27 Atividade de educação em saúde realizada no Parque Estadual dos Três Picos em 2019 onde A: Equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em diptera e hemiptera; B: Material exposto no aniversário do PETP; C: Jogos educativos sobre as leishmanioses; D: Folders informativo-educativo sobre as leishmanioses, material produzido e fornecido pelo laboratório de referência do LIVEDIH. ....	60
Figura 28 Atividade online de aniversário do Parque Estadual dos Três Picos onde A: Programação completa da atividade divulgada pelo INEA; B: Capa de apresentação da palestra sobre insetos vetores no PETP apresentada pela Mst Thamiris Balthazar.....	62
Figura 29 Atividade de educação em saúde realizada no Parque Estadual dos Três PICOS EM 2022 onde A: Equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em	

diptera e hemiptera; B: Exposição do material para crianças pela aluna de IC Rosemere;	
C: Exposição do material para adultos pela aluna de IC Samantha; D: Material didático em biscuit e massinha para exposição. ....	63
Figura 30 Ciclo Silvestre da <i>Leishmania braziliensis</i> proposto pelos resultados moleculares do presente estudo .....	70

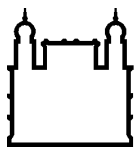
## Índice Tabelas:

Tabela 1 Planejamento de Campo baseado nas fases lunares e respeitando períodos seco e chuvosos. (58).....	17
Tabela 2 Índice de abundância de espécies capturadas. “Index of species abundance” (isa), convertido em “Standardized index of species abundance” (sisa), na estação chuvosa, no período seco e na composição total da espécie, sendo definida a posição total da espécie com base sobre o sisa total.....	43
Tabela 3 Test <i>t-student</i> para diversidade do período chuvoso, assumindo nível de significância $p= 0,05$ (5% de probabilidade). * HÁ alta diferença significativa entre as diversidades, segundo o teste t para H’ a 5% de probabilidade .....	48
Tabela 4 Test <i>t-student</i> para diversidade do período seco, assumindo nível de significância $p= 0,05$ (5% de probabilidade). * HÁ alta diferença significativa entre as diversidades, segundo o teste t para H’ a 5% de probabilidade .....	49
Tabela 5 proporção de Macho e Fêmea (M : F) das espécies de flebotomíneos capturados nas diferentes fases da lua. Null = correlação nula. ....	54
Tabela 6 Avaliação do hábito alimentar e presença de DNA de <i>Leishmania</i> spp. de fêmeas ingurgitadas capturadas de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020 no Parque Estadual dos Três Picos. ....	55
Tabela 7 Amostras de fêmeas ingurgitadas positivas para sangue no período de Janeiro de 2019 a fevereiro de 2020. ....	56
Tabela 8 Identificação da presença de KDNA de <i>Leishmania</i> spp. em fêmeas ingurgitadas e fêmeas não ingurgitadas por estação de monitoramento .....	58
Tabela 9 Identificação da avaliação do hábito alimentar por estação de monitoramento .....	59



**Índice anexos:**

<b>Anexo 1 Artigo publicado em 11/02/2022</b> .....	83
Anexo 2 Artigo submetido em 11/05/2022 .....	88
<b>Anexo 3 Tabela de avaliação do hábito alimentar</b> .....	89
Anexo 4 Distribuição das espécies identificadas no estado do Rio de Janeiro distribuídas por municípios e localidades. ....	91



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Ecologia e Vigilância Entomológica de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae),  
Vetores de *Leishmania* spp., nos limites da sede do Parque Estadual dos Três Picos,  
Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.**

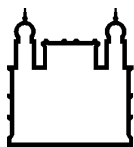
### RESUMO

#### TESE EM MEDICINA TROPICAL

**Thamiris D’Almeida Balthazar**

As leishmanioses são doenças negligenciadas, emergentes e tem revelado um processo de expansão geográfica em várias regiões do mundo sendo transmitida através da picada da fêmea de flebotomíneo infectada por parasitos do gênero *Leishmania*. O conhecimento da composição faunística das espécies de flebotomíneos em uma determinada área tem grande relevância para a identificação de potenciais vetores do parasito, além de dados sobre a bioecologia que podem contribuir no emprego de ações nos programas de controle. O presente estudo visou identificar a fauna de flebotomíneos no Parque Estadual dos Três Picos (PETP), onde não existem dados sobre esses dípteros, além de ser uma área de visitação humana com moradias no seu entorno. Além disso, buscou-se avaliar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos e identificar as fontes alimentares. Foram realizadas capturas mensais utilizando armadilhas luminosas CDC, modelo HP, no período entre 18h a 06h do dia seguinte durante duas noites consecutivas, por 16 meses. A identificação das espécies de flebotomíneos foi realizada baseada na análise dos caracteres morfológicos. A identificação das espécies de *Leishmania* spp. circulantes e da fonte alimentar das fêmeas foram realizadas a partir análise molecular por PCR. Após 12 campanhas de campo foram capturados 2.826 espécimes, distribuídos em 21 espécies identificadas, sendo quatro espécies de importância médica, *Bichromomyia flaviscutellata*; *Migonemyia migonei*; *Pintomyia fischeri*; *Psychodopygus hirsutus hirsutus*. Os dados obtidos entre as estações de monitoramento nos períodos seco e chuvoso, indicam que o período da lua nova apresentou a maior riqueza de espécies enquanto a lua cheia apresentou a maior dominância e densidade de flebotomíneos. Pode-se observar também uma forte correlação ambiental entre as espécies capturadas no estudo. Além disso, foi identificado sangue da espécie *Dasytus septemcinctus* (tatu-mirim) em fêmeas ingurgitadas do flebotomíneo *Ps. hirsutus hirsutus*, bem como identificou-se também a presença de DNA de *Leishmania braziliensis* em fêmeas ingurgitadas e fêmeas não ingurgitadas também de *Ps. hirsutus hirsutus*, sugerindo a ocorrência de um ciclo silvestre de Leishmaniose Tegumentar Americana entre essas espécies no PETP. Concluiu-se que estudos de vigilância devem ser realizados no local, bem como ações de educação em saúde, uma vez que o PETP se apresenta como um potencial local de risco de infecção.

**Palavras-Chave:** Leishmanioses Tegumentar Americana; Flebotomíneos; Bioecologia



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Ecology and Entomological Surveillance of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae), Vectors of *Leishmania* Spp., within the limits of the Três Picos State Park, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.**

#### **ABSTRACT**

#### **PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL**

**Thamiris D'Almeida Balthazar**

Leishmaniasis is a neglected, emerging disease and has revealed a process of geographic expansion in several regions of the world. Being transmitted through the bite of a female sand fly infected by parasites of the genus *Leishmania*. Knowledge of the faunal composition of sand fly species in a given area is highly relevant for the identification and presence of potential vectors of the disease, as well as data on bioecology that can contribute to the use of actions in control programs. The present study aimed to identify the sandfly fauna in the Três Picos State Park (PETP), where there are no data on these dipterans, in addition to being an area of human visitation with houses in its surroundings. In addition, it sought to evaluate the presence of *Leishmania* spp. in female sandflies and identify food sources. Monthly captures were performed using CDC light traps, HP model, between 6:00 pm and 6:00 am of the following day, during two consecutive nights at different monitoring stations. The identification of sand fly species was performed based on the analysis of morphological characters. The identification of *Leishmania* spp. circulating and the food source of females were performed from molecular analysis by PCR. After 12 field campaigns, 2826 specimens were captured, distributed in 21 species identified, four of which are of medical importance: *Bichromomyia flaviscutellata*; *Migonemia migonei*; *Pintomyia fischeri*; *Psychodopygus hirsutus hirsutus*. The data obtained between the monitoring stations in the dry and rainy periods indicate that the new moon period presented the highest species richness while the full moon presented the highest dominance and density of sandflies. A strong environmental and seasonal correlation can also be observed between the species captured in the study. In addition, it was identified as a feeding habit of *Ps. hirsutus hirsutus* the armadillo *Dasypus septemcinctus*, as well as the presence of *Leishmania braziliensis* DNA in engorged and non-engorged females of *Ps. hirsutus hirsutus*, suggesting the occurrence of a sylvatic cycle of these species in the region. It is concluded that surveillance studies should be carried out at the site, as well as health education actions, since PETP presents itself as a potential site of risk of infection.

**Key words:** American Cutaneous Leishmaniasis; sandflies; bioecology

## 1. Introdução:

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial, emergente, importantes no contexto socioambiental e em franca expansão geográfica, resultando num grave problema de saúde pública global. Estão inseridas entre as doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, sendo ignorada das discussões sobre prioridades neste campo, ainda que estejam categorizadas como doenças infecciosas que produzem expressiva carga de indivíduos acometidos (1,2). As condições socioeconômicas das populações, as intervenções ambientais de magnitude, o desenho da paisagem (vegetação e relevo) e as variações climáticas (temperatura, umidade, precipitação e estiagem) são elementos que têm papel de destaque dentre os que influenciam na ecoepidemiologia das doenças (3–6).

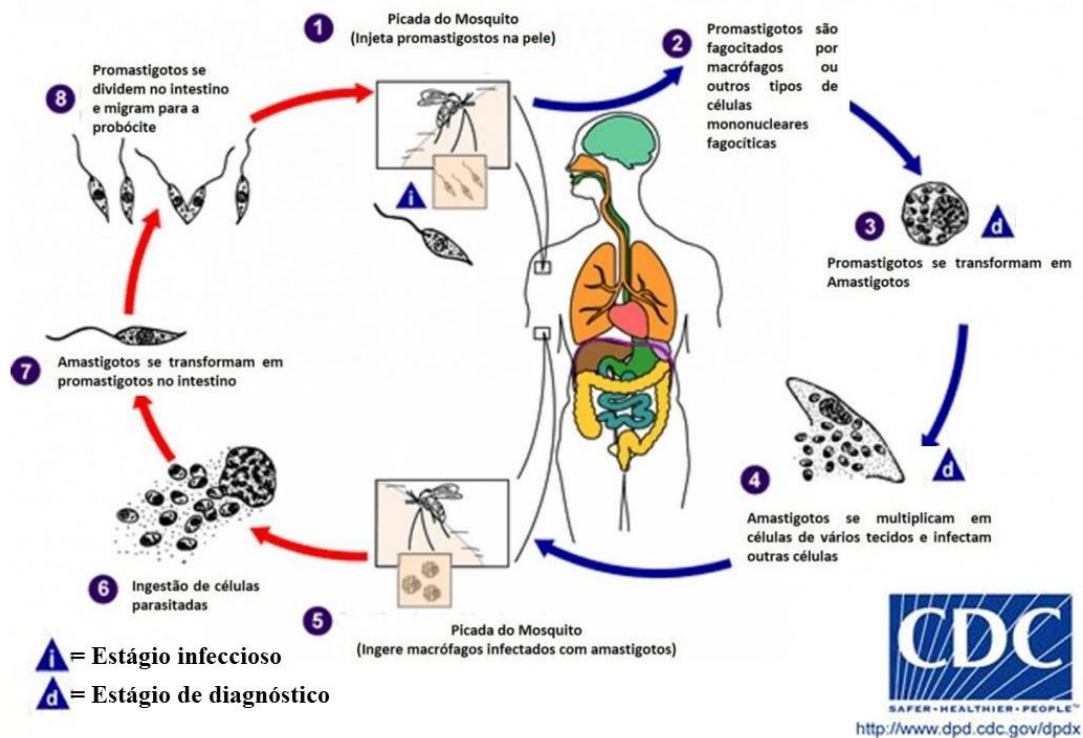
As leishmanioses apresentam uma diversidade clínica e epidemiológica, e as seguintes formas clínicas: a leishmaniose cutânea, que causa lesões cutâneas, principalmente úlceras em partes expostas do corpo; a leishmaniose mucocutânea, forma grave que resulta na destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e a leishmaniose visceral (LV), forma que pode levar os indivíduos ao óbito se não tratada e que acomete as células do fígado e baço. As doenças são endêmica em 98 países em quatro continentes, e o Brasil é um dos países que mais contribuem com o número de casos no mundo. Estimativas sugerem que existam cerca de 350 milhões de pessoas expostas às leishmanioses, vivendo em ambientes onde o risco é iminente. No mundo a incidência anual está na ordem de 900 mil a 1,6 milhão de casos humanos, sendo 700 mil a 1,2 milhão classificados como leishmaniose cutânea e mucosa e 200-400 mil como leishmaniose visceral. Os óbitos em decorrência da doença são estimados entre 20 mil - 40 mil ao ano e atualmente cerca de 12 milhões de pessoas podem estar infectadas (5,7)

Diferentes espécies de vetores, parasitos e reservatórios estão envolvidos na cadeia epidemiológica das leishmanioses, resultando em padrões distintos de transmissão. Os vetores são pequenos insetos dípteros, pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. No mundo são descritos 1.026 táxons do grupo das espécies (espécies ou subespécies), sendo 994 válidos e 32 fósseis, onde no Continente Americano registra-se 549 espécies, 532 atuais e 17 fósseis (8,9). Cerca de 10% dessas espécies podem estar implicadas na transmissão de doença (10–12). Os flebotomíneos apresentam hábitos

preferencialmente crepuscular noturno, e no Brasil são conhecidos popularmente por diversos nomes de acordo com a região de ocorrência: asa branca, asa dura, cangalhinha, birigui, tatuquira, dentre outros.

A transmissão da *Leishmania* spp. se dá através da picada da fêmea de flebotomíneo infectada, uma vez que somente elas estão aptas a exercer a alimentação sanguínea. Os reservatórios são mamíferos silvestres e domésticos pertencentes às Ordens: Marsupialia, Carnivora, Rodentia, Edentata ou Xenartha, Primata e Artiodactyla. Os parasitas que causam a leishmaniose são protozoários da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e apresentam duas formas distintas, a amastigota, encontrada nos vertebrados e a promastigota, forma infectante, que se desenvolve no trato digestório das fêmeas de flebotomíneos (13).

Dessa forma, o ciclo das leishmanioses ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas, ao realizarem o repasto sanguíneo no indivíduo vertebrado, liberam a forma promastigota metacíclica a qual é fagocitada pelos macrófagos, onde se modificam para a forma amastigota. Esta se multiplica no interior do macrófago até sua lise, sendo fagocitadas por novos macrófagos. Até que, em um novo repasto sanguíneo, outra fêmea de flebotomíneo poderá ingerir junto ao sangue as formas amastigotas livres ou aquelas contidas em macrófagos, as quais posteriormente se transformam em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo, onde se multiplicam e migram para probóscide para que sejam liberadas novamente em um novo repasto sanguíneo como formas promastigotas metacíclicas (14) (Figura 1)



**FIGURA 1 CICLO DA LEISHMANIA SPP. USANDO O HOMEM COMO MODELO DE HOSPEDEIRO VETEBRADO. FONTE: CENTER OF DISEASE CONTROL(CDC). TRADUZIDO POR THAMIRIS BALTHAZAR.**

No território brasileiro as leishmanioses tem representado um grande desafio no seu controle, dada às particularidades dos ambientes de ocorrência e da complexidade dos ciclos de transmissão. São consideradas um sério problema de saúde pública, cuja expansão geográfica tem possibilitado o estabelecimento em áreas urbanas das médias e grandes cidades brasileiras. O Brasil é um dos países que mais contribuem com casos da doença no mundo, contabilizando 72,6% dos casos de leishmaniose cutânea e 96% dos casos de leishmaniose visceral contabilizados nas Américas (7).

A leishmaniose visceral no Brasil ocorre em 23 estados brasileiros inseridos em todas as regiões geográficas. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é considerado o mais importante vetor nas Américas, entretanto, no Brasil *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) atua como transmissor em Corumbá e Ladário no Mato Grosso do Sul (15) e em Jaciara no Mato Grosso (16), outra espécie, *Migonyemyia migonei* (França, 1920), foi apontada como potencial vetor em Pernambuco (17).

Quanto à leishmaniose cutânea, no Brasil é registrada em todos os estados e associada a uma diversidade de leishmânias dermatópicas, cuja transmissão é atribuída a algumas espécies de flebotomíneos, determinando assim, diferentes ciclos ecoepidemiológicos (18). Neste cenário destaca-se a *Leishmania braziliensis* (Vianna, 1911), distribuída em todas as unidades federativas, e tem como o principal vetor *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939) no estado do Rio de Janeiro, e o principal transmissor do parasito é a *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva 1912), espécie amplamente distribuída no território fluminense(19).

No norte do Brasil os casos de leishmaniose cutânea causados por *Leishmania guyanensis* (Floch, 1954), tem como o principal vetor *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977) (13,18,20). Ressalta-se ainda, casos graves de leishmaniose cutânea-difusa, causados por *Leishmania amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972), transmitida pelo flebotomíneo *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) e presente nas regiões Norte, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste, denota um processo de expansão geográfica, (13,18). No município de Paraty foi reportado um caso humano dessa forma grave, fato que ainda não havia sido registrado no estado do Rio de Janeiro, entretanto, não se sabe qual espécie de flebotomíneo pode estar envolvida na transmissão na área (21).

Estudos são realizados para entender as questões epidemiológicas de forma a direcionar medidas preventivas para as leishmanioses. Neste sentido, uma revisão sobre a competência vetorial de *Lutzomyia longipalpis* apontou relação direta da capacidade de adaptação desse vetor ao ambiente urbano com casos humanos de leishmaniose visceral (22). O mesmo pôde ser observado em relação à leishmaniose cutânea, causada por *L. braziliensis*, quando se detectou que o vetor *Ny. intermedia* adaptou-se ao habitat peridoméstico (18). A proximidade das populações humanas aos potenciais vetores em ambientes silvestre, juntamente com a adaptação do vetor respondendo ao intenso processo de urbanização, são fatores epidemiológicos relevantes para o aumento da exposição humana à doença (23).

## 1.1 A Leishmaniose tegumentar americana e seus vetores:

O Brasil é o país com a maior riqueza de espécies de flebotomíneos do mundo (24). Dentre as 532 taxas (espécies ou subespécies) atualmente descritas nas Américas (8), 26 espécies já foram confirmadas ou são suspeitas de transmitir a *Leishmania* spp. no Brasil (25). Das quais, dentre as 11 espécies de *Leishmania* spp. dermatrópicas que são reconhecidas nas Américas e causam doença humana, sendo 7 dessas são registradas no Brasil (26).

A espécie *Leishmania braziliensis* é o agente etiológico mais frequente no território nacional, com destaque para as regiões Nordeste e Sudeste, a causar a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), a qual pode ser causada também pelas espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* (14). E, como destacado por Brazil & Brazil (27), devido a ampla distribuição do protozoário *L. braziliensis*, estando presente em praticamente todos os estados brasileiros, várias espécies de flebotomíneos podem estar associadas ao seu ciclo de transmissão.

Segundo a última revisão realizada por Galvis-Ovallos et al. (25) quanto às Leishmanioses no Brasil, o protozoário *L. braziliensis* possui 15 vetores confirmados no país, sendo esses: *Psychodopygus wellcomei* (Shaw e Lainson, 1971), *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia shawi* (Fraiha, Ward & Ready, 1981), *Nyssomyia whitmani*, *Evandromyia edwardsi* (Mangabeira, 1941), *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psychodopygus amazonensis* (Root, 1934), *Psychodopygus chagasi* (Costa Lima, 1941), *Psychodopygus hirsutus hirsutus* (Mangabeira, 1942), *Psychodopygus paraensis* (Costa Lima, 1941) e *Psychodopygus squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912). Contudo, dentre essas espécies, as principais vetoras de *L. braziliensis* no Brasil são *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani* com ampla distribuição em todas as regiões brasileiras, exceto na região Norte (27)

Quanto as espécies de flebotomíneos vetoras, no estado do Rio de Janeiro, a espécie *Ny. intermedia* é considerada principal vetora de *L. braziliensis*, tendo a espécie *Mg. migonei* considerada em diversos estudos como vetor secundário desta *Leishmania* sp. quando a espécie primária não se encontra presente (28,29) Contudo, em regiões onde



a ausência das espécies vetoras são registradas ou mesmo em baixa densidade destas, espécies que ainda não foram confirmadas como vetores podem estar atuando como o vetor primário. Dessa forma, estudos em áreas ainda não investigadas podem auxiliar na caracterização de novos potenciais vetores (19,29,30). Segundo Killick-Kendrick (30), para que uma espécie de flebotomíneo seja considerada vetor, ela deve preencher alguns critérios, tal como, isolamento de forma promastigota no flebotomíneo, identificação da leishmania na região anterior do intestino e na válvula estomodeal no xenodiagnóstico, o flebotomíneo ser antropofílico ou atraído pelo mamífero reservatório, fortes associações ecológicas e transmissão e infecção experimental. Além desses critérios, Ready (31) incluiu dois critérios de modelagem matemáticas que podem comprovar ainda mais a capacidade vetorial desses insetos. Dessa forma, avaliações em áreas ainda não estudadas poderão incriminar novos vetores de *Leishmania* spp.

## 1.2 Bioecologia de Phlebotominae

Os flebotomíneos são insetos da ordem Diptera e subfamília Phlebotominae, taxonomicamente identificados por possuírem o corpo delgado de coloração palha, cerdas ao longo do corpo e pernas longas (32), diferenciando-se taxonomicamente dos demais componentes da família Psychodidae devido suas asas lanceoladas, antenas com 14 flagelômeros e suas fêmeas serem mandibuladas e com um par de espermatecas presente(9).

Esses insetos possuem grande importância tendo em vista seu interesse médico-veterinário na transmissão de patógenos, tal como o protozoário do gênero *Leishmania* spp. No entanto ainda há poucos estudos sobre a bioecologia e distribuição desses dípteros, havendo assim uma grande lacuna no conhecimento acerca destes (32). sendo esses estudos em maioria com foco na família de espécies de interesse médico Phlebotominae (33).

Dessa forma, estudos quanto ao levantamento da fauna desses insetos em uma determinada região ainda não avaliada são importantes não só para identificar a distribuição das espécies e presença de potenciais vetores que podem indicar uma importância epidemiológica para a região, mas também contribuem no conhecimento das

características ambientais favoráveis ao desenvolvimento e biologia desses flebotomíneos.. Esta compreensão da biologia dos insetos nos auxilia a entender e a direcionar nossos olhares para a possibilidade de investigações da epidemiologia de patógenos de transmissão vetorial (34–37).

Tal como todos os demais representantes da ordem Diptera, os flebotomíneos, possuem o desenvolvimento holometabólico, compreendendo em seu ciclo as fases de ovo, seguido de quatro estádios na fase larval, uma fase pupal da qual, então, emerge o adulto (24) (Figura 2). Uma importante característica do ciclo desses insetos está no ambiente favorável para o desenvolvimento das formas imaturas, ocorrendo em geral no ambiente terrestre, com muita umidade e rico em matéria orgânica em decomposição (32)



**FIGURA 2 CICLO DA FAMÍLIA PHLEBOTOMINAE, REPRESENTANDO AS FASES DE OVO, QUATRO ESTÁDIOS LARVAL, UMA FASE PUPAL E ADULTO, MONTADO A PARTIR DA DESCRIÇÃO DO CICLO DESCRITA POR FORATTINI, 1924(8). MONTAGEM DO CICLO REALIZADA PELA AUTORA THAMIRIS BALTHAZAR E IMAGENS DE MAURÍCIO VILELA CEDIDAS PELO LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA EM DIPTERA E HEMIPTERA – LIVEDIH.**

As formas imaturas se desenvolvem em criadouros naturais, tais como: toca de animais, oco de árvores, fendas de rochas, bem como chiqueiros, currais e galinheiros

(24), sendo esses diferentes habitats relacionados às espécies específicas. De modo que, é possível associar a fauna local com as características ambientais da região.

As formas adultas dos insetos também possuem características ambientais que são favoráveis à sua permanência bem como influenciam positivamente para a cópula e ovo postura. Aguiar & Vilela (37) observaram que os indivíduos adultos de flebotomíneos se abrigam em locais, não só que oferecem benefícios ao seu ciclo de vida, com pouca ou nenhuma luminosidade, umidade favorável e matéria orgânica em decomposição, mas também locais que os protejam de mudanças bruscas ambientais como grandes deslocamentos de vento e chuva.

A permanência dos flebotomíneos em abrigos ou criadouros de animais favorecem ainda outra importante característica para o desenvolvimento desses indivíduos e manutenção de seu ciclo: a realização de repasto sanguíneo pelas fêmeas, a fim de maturar seus ovários para o desenvolvimento dos ovos (24,32). Machos e fêmeas desses insetos possuem a necessidade de ingerir carboidratos como fonte de energia, sendo esses compostos provenientes principalmente da seiva vegetal e secreções açucaradas de afídeos e outros homópteros (24). Devido ao repasto sanguíneo efetuado em mamíferos reservatórios do protozoário, as fêmeas podem se infectar, e transmitir patógenos, como o protozoário *Leishmania* spp. responsáveis por causar as leishmanioses.

Dessa forma, compreender a bioecologia da fauna de uma determinada região poderá além de favorecer o conhecimento da distribuição das espécies, nos apresentar importantes informações para a ecoepidemiologia das leishmanioses na região.

### **1.3 Influência das fases da lua na biologia de Phlebotominae:**

A atividade dos flebotomíneos é influenciada por diferentes fatores como temperatura, altitude, umidade e luminosidade (24). A luminosidade da lua é um fator já estudado, porém, não há um consenso quanto a sua influência na biologia dos flebotomíneos, bem como, quanto a fase de melhor atração desses dípteros.

O estudo de Bidlingmayer (38) já apontava a influência da lua nas capturas de dípteros culicídeos utilizando armadilhas de sucção sem o atrativo luminoso, onde o autor

descreveu que a luminosidade da lua cheia mantém uma claridade por maior tempo, se assemelhando ao crepúsculo, e, dessa forma, associou como um fator que influenciava positivamente na maior atividade dos mosquitos (38).

A atração dos flebotomíneos pela luz das armadilhas luminosas sugere diversas teorias para esta tendência, porém, se faz mais pertinente a teoria de que a luz da armadilha provoca uma desorientação nos insetos, sendo assim atraídos e capturados por estas (39). Diversos autores destacam a influência da luz ambiente na efetividade da atração de flebotomíneos por armadilhas luminosas, onde a luminosidade da lua é destacada em diversos estudos apontando que nas noites de lua cheia há uma maior competitividade com as armadilhas luminosas, o que ocasiona uma menor atração dos espécimes de flebotomíneos, sendo então a lua cheia considerada a lua de menor densidade de flebotomos coletados por esta armadilha (40–46)

Contudo, há também a hipótese de que os machos são mais atraídos no período de lua cheia aos galinheiros e a liberação de feromônios resultaria na maior atração também de fêmeas neste período de lua (47). Dessa forma, os estudos não apontam um consenso quanto o período lunar de melhor atração dos flebotomíneos e qual o principal fator que influencia a atividade destes insetos e as espécies incriminadas como vetores de *Leishmania* spp.

#### **1.4 Situação epidemiológica e distribuição entomológica do Rio de Janeiro:**

Segundo Galati (2021), em sua última atualização quanto a distribuição e identificação das espécies de flebotomíneos nas Américas, atualmente há 1.047 táxons do grupo das espécies (espécies ou subespécies) descritos dentre esses 1.016 são táxons atuais, ou seja, encontram-se distribuídos pelas américas e 31 são fósseis identificados e não há representantes vivos até onde há estudos (8). Dentre as 532 espécies atuais identificadas nas Américas, 64 foram notificadas no estado do Rio de Janeiro (8), das quais 4 são espécies confirmadas como vetores de *Leishmania (Viannia) braziliensis* segundo os critérios de Killick-Kendrick (30), bem como há espécies suspeitas de serem vetoras desse protozoário, tal como a espécie *Psychodopygus hirsutus hirsutus* (8,19,24,28,48–50).

No estado do Rio de Janeiro a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada exclusivamente pelo protozoário *L. braziliensis*, sendo esse agravo endêmico no estado (48), o qual apresenta ampla distribuição principalmente dos vetores dos agentes etiológicos já comprovados das Leishmanioses. Em um estudo de revisão publicado em 2014, apontam a distribuição das espécies *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Bi flaviscutellata* e *Mg. migonei* incriminadas como vetores e uma ampla distribuição de casos de LTA no estado(19).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2007 a 2020 o estado do Rio de Janeiro teve um total de 929 casos de LTA notificados, na qual a capital concentrou o maior número de casos, notificando 211 nesse período (51) Dentre esses, 79 foram notificados no ano de 2019. De forma que, apesar de endêmico, o estado tem reduzido significativamente o número de casos anuais (48). Contudo, ainda há um elevado número ocorrendo bem como há muitas regiões onde não se conhece a fauna flebotomínea ainda que haja casos de LTA na região.

Dessa forma, estudos quanto a distribuição das espécies bem como dados epidemiológicos poderão auxiliar para ampliar o conhecimento desse agravo no estado, visando auxiliar na redução dos casos ainda existentes.

### **1.5 O Parque Estadual dos Três Picos:**

O Parque Estadual dos Três Picos (PETP) é uma unidade de proteção localizada no limite de cinco municípios do estado do Rio de Janeiro: Cachoeiras de Macacu, Nova Friburgo, Teresópolis, Guapimirim e Silva Jardim. É considerado a maior unidade de conservação sob proteção integral estadual (52). Ainda assim, conta com diversas moradias e engloba alguns centros urbanos dentro de seus limites estabelecidos.

Fundado em 2002, o PETP desde então vem mantendo não só a preservação de áreas já antes preservadas como também mantém o reflorestamento de áreas que se encontravam degradadas. Dessa forma, o PETP é caracterizado como uma floresta ombrófila densa, na qual contém áreas silvestres preservadas bem como áreas de mata secundária proveniente de um reflorestamento recente (52), fazendo parte de um

importante corredor ecológico que abriga a maior extensão de florestas atlânticas remanescentes, a Serra do Mar (53).

Devido sua ampla extensão de fragmentos da Mata Atlântica, inclusive com áreas de visitações ecoturísticas, bem como moradias em seu interior (Figura 3), o PETP apresenta um ambiente favorável para a introdução do homem no ciclo enzoótico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Contudo, até o momento, inquéritos sobre o conhecimento sobre a fauna de flebotomíneos na área não foram realizados, o que se configura de grande relevância a execução de estudos bioecológicos e epidemiológicos sobre os vetores de *Leishmania* spp. na região.

Ainda que haja alguns estudos realizados em diferentes fragmentos de Mata Atlântica da Serra do Mar, poucos estudos foram realizados em fragmento de mata próximo ao PETP. Um desses estudos em fragmento de mata próximo ocorreu no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) com coletas entre os anos de 1981 - 1983 (54). Neste estudo foi identificada uma fauna com 17 espécies, sendo *Psathyromyia barrettoi* (Mangabeira, 1942) a espécie em maior densidade de espécimes coletados, seguida de *Psychodopygus ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940) e *Psychodopygus hirsutus hirsutus* respectivamente, sendo que esta última já apontou potencial importância médico-veterinária com o relato de um isolado do complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* (50).

Outro importante estudo se deu na área da Reserva Biológica de Poço das Antas, localizada entre os Municípios de Silva Jardim e Casemiro de Abreu, e em uma Reserva Particular de Patrimônio Natural (Fazenda Bom Retiro), localizada no município de Casemiro de Abreu (55), sendo esses fragmentos localizados próximos à extensão do PETP. O estudo revelou uma fauna de flebotomíneos composta por 10 espécies, onde a espécie *Ps. hirsutus hirsutus* também esteve dominante.

Segundo dados do SINAN, no período entre 2007 e 2020, foram notificados 70 casos de LTA dentro dos limites dos cinco municípios. Dentre esses, 16 casos foram notificados no município de Cachoeiras de Macacu, Guapimirim registrou um caso humano de Leishmaniose Visceral (LV) no ano de 2009 e em Teresópolis, também se notificou um caso da doença no ano de 2014 (51). Os dados reafirmam a importância de estudos na área do PETP, uma vez que, podemos sugerir que haja casos subnotificados na região. Nesta perspectiva, torna-se importante avaliar os aspectos da bionomia desses

dípteros e entender a dinâmica e distribuição dos potenciais casos humanos que ocorrem na região, de forma que a obtenção desses dados no ambiente natural poderá indicar ações de prevenção e controle.



**FIGURA 3 MAPA DA ÁREA DA SEDE DO JEQUITIBÁ DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS APONTANDO AS RESIDÊNCIAS EM SEU INTERIOR (MARCADAS EM VERMELHO) E A SEDE DO PARQUE (MARCADA EM AMARELO). FONTE: ACERVO PRÓPRIO, GERADO A PARTIR DO SOFTWARE QGIS**



## **2. Justificativa:**

Até o momento, registros sobre a fauna de flebotomíneos na área do PETP não foram realizados, o que se configura de grande relevância a execução de estudos bioecológicos e epidemiológicos sobre os vetores de *Leishmania* spp. na região, a fim de contribuir para o conhecimento das espécies que ocorrem no PETP, e sobre a dinâmica ecoepidemiológica que envolvem as espécies de vetores e parasitos no ambiente silvestre.

Sendo assim, a pergunta que norteia todo o nosso estudo é: quais os possíveis ciclos silvestres de Leishmaniose Tegumentar Americana podem estar ocorrendo na sede do Parque Estadual dos Três Picos (PETP) e quais os aspectos ecológicos envolvidos?

Dessa forma, o presente estudo objetivou produzir dados bioecológicos sobre os flebotomíneos, ampliando o conhecimento sobre esses dípteros no estado do Rio de Janeiro, revelando a composição faunística dos flebotomíneos na área do PETP na perspectiva de contribuir para a execução de ações nos programas de controle, bem como resultar em informações sobre o agravo para a comunidade residente e visitantes da área de conservação. Além disso, os resultados obtidos auxiliaram na execução de atividades de educação em saúde voltados especificamente à comunidade visitante e residente do PETP de forma a deixar um legado de prevenção às diferentes formas das leishmanioses que podem ocorrer nesta área de proteção.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **Objetivo Geral:**

Avaliar os aspectos ecológicos e epidemiológicos das leishmanioses baseado no levantamento da biodiversidade dos flebotomíneos na área do Parque Estadual Três Picos, no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil.

#### **Objetivos específicos:**

1. Realizar uma revisão de espécies de flebotomíneos do estado do Rio de Janeiro no período de 2015 a 2022.
2. Avaliar a diversidade de espécies de flebotomíneos do Parque Estadual dos Três Picos.
3. Avaliar a frequência das espécies de flebotomíneos do PETP de acordo com o ciclo lunar.
4. Avaliar o hábito alimentar e a presença de DNA de *Leishmania* spp. nos flebotomíneos coletados do PETP.
5. Realizar atividades de educativas e de promoção da saúde no PETP relacionado às leishmanioses.

#### **4. Material e métodos:**

##### **4.1 Revisão Bibliográfica sobre os Flebotomíneos no estado do Rio de Janeiro:**

Esta revisão tem como objetivo complementar a revisão já publicada por Carvalho e colaboradores(19), a qual avaliou apenas as espécies já confirmadas como vetor da *Leishmania brasiliensis* no estado do Rio de Janeiro até o ano de 2014. Sendo assim, nosso estudo de revisão buscou realizar o levantamento dos cinco anos seguintes, contemplando o período de 2015 a 2020, bem como realizou o levantamento neste período também das espécies suspeitas de ser vetor segundo a literatura.

A pesquisa bibliográfica foi realizada nas seguintes bases de dados: Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Scopus (<http://www.scopus.com>), Scielo (<http://www.scielo.org>), Biblioteca Virtual em Saúde (<http://regional.bvsalud.org>) e Google Acadêmico (<http://scholar.google.com>). Bancos de dados de teses da Fundação Oswaldo Cruz também foram consultados (<http://www.arca.fiocruz.br>). Os resultados das buscas formaram um banco de dados compilado com registros de espécies por município e coordenadas de registro a fim de realizar a distribuição espacial dessas espécies.

Foram confeccionados mapas de distribuição para potenciais vetores de *Leishmania* spp. e casos humanos de LTA registrados pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Para o Mapa de revisão contendo a distribuição de casos no período de 2015 a 2022 foram utilizados os bancos de dados disponíveis no TABNET DATASUS, disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os mapas foram elaborados com o município divisão territorial do IBGE (2010), no software QGis 3.22.7.

A fim de padronizar a nomenclatura das espécies encontradas foi adotada neste estudo a nomenclatura utilizada por Galati(8,9,56).

##### **4.2 Levantamento da fauna de flebotomíneos do PETP:**

O estudo foi realizado na sede do Jequitibá do Parque Estadual dos Três Picos (S: 22°24.834' HO: 42°36.825') no município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de

Janeiro. A área de proteção é caracterizada por ser um fragmento de Mata Atlântica, composto por uma floresta ombrófila densa e de clima tropical (52).

### 4.3 Captura dos espécimes:

A captura dos espécimes adultos foi realizada mensalmente durante duas noites consecutivas com o uso de armadilha luminosa CDC, modelo HP (57), disponibilizadas nas Estações de Monitoramento (EM's) no período do final da tarde até a manhã seguinte (das 18h às 06h). As capturas ocorreram dentro do período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020,

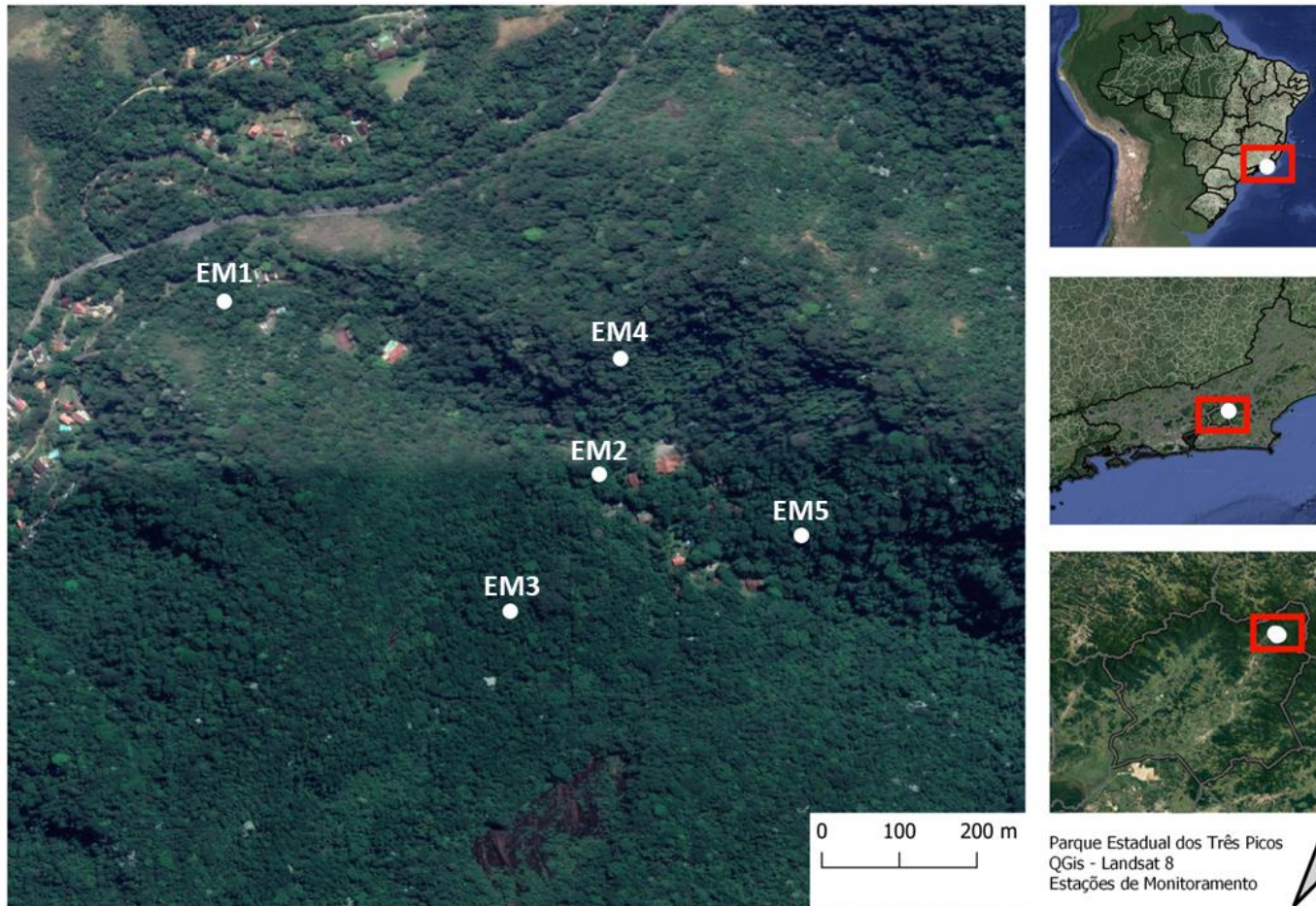
O cronograma de capturas foi pensado de forma a contemplar o mesmo quantitativo de incursões ao campo distribuídas entre as luas, acompanhando esses períodos pelo aplicativo *moon fases*, e os períodos seco e chuvoso (Tabela 1), sendo os meses de período chuvoso definido por Minuzzi et al. (58).

**TABELA 1 PLANEJAMENTO DE CAMPO BASEADO NAS FASES LUNARES E RESPEITANDO PERÍODOS SECO E CHUVOSOS. (58)**

	Crescente	Cheia	Minguante	Nova
2019	# 15 a 17 de janeiro	19 a 21 de março	# 26 a 28 de fevereiro	3 a 5 de junho
	23 a 25 de abril	14 a 16 de agosto	14 a 16 de maio	2 a 4 de julho
	# 10 a 12 de setembro	#11 a 13 de novembro	#17 a 19 de dezembro	#28 a 29 de outubro
2020	#4 a 6 de fevereiro		#14 a 16 de janeiro	
2021		23 a 27 de agosto		
		# 16 a 21 de setembro		

Legenda: # período chuvoso pré estabelecido por Minuzzi et al, (58).

Foram demarcadas cinco estações de monitoramento (EM's) que possuem alguma relação com a circulação humana no interior da sede do parque, a fim de avaliar aspectos da bioecologia dos flebotomíneos (Figura 4). Estas EM's se distanciavam em 200 a 500 metros aproximadamente, apresentando microhabitats diferentes em cada estação de monitoramento.



**FIGURA 4 MAPA LOCALIZANDO AS ESTAÇÕES DE MONITORAMENTO DEMARCADAS NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS.**

A EM1 (Trilha da entrada) caracterizada pela entrada do parque onde além de residências próximas, é notório a constante circulação humana onde encontramos materiais de ritos religiosos, latas e garrafas de bebidas e também há uma pequena trilha de passagem dos moradores ao redor; EM2 (Trilha dos Cristais) localizada no trajeto da trilha dos cristais, que se encontra próximo a residências encontradas no interior do PETP, a EM3 (Trilha do Jequitibá) localizada no trajeto da trilha do Jequitibá, a qual é a trilha

de maior visitação humana desta sede do PETP, ainda que mantenha uma mata mais preservada e a EM4 (Trilha dos bichos) localizada no trajeto da trilha dos bichos, também utilizada para atividades ecoturísticas, e que possui este nome devido ao grande relato de visualização da mastofauna de pequeno porte e herpetofauna, sendo encontrado ainda inúmeros buracos usados como tocas de animais; e, a EM5 (Trilha das águas) é caracterizada pela passagem das tubulações para o transporte de água à sede do parque e às casas localizadas no interior do mesmo, local onde há constante passagem humana para consertos e manutenção.



**A**



**B**



C



D



E

**FIGURA 5 ESTAÇÕES DE MONITORAMENTO DEMARCADAS NO LIMITE DA SEDE DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS, ONDE FORAM REALIZADO AS COLETAS MENSAS DE FLEBOTOMÍNEOS. A: CDC INSTALADA NA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO 1; B: CDC INSTALADA NA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO 2; C: CDC INSTALADA NA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO 3; D: CDC INSTALADA NA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO 4; E: CDC INSTALADA NA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO 5.**

Todo o material capturado foi mantido nas gaiolas de suporte da armadilha CDC, e em seguida abatidos em câmara fria. Posteriormente, foi efetuada a triagem, separando

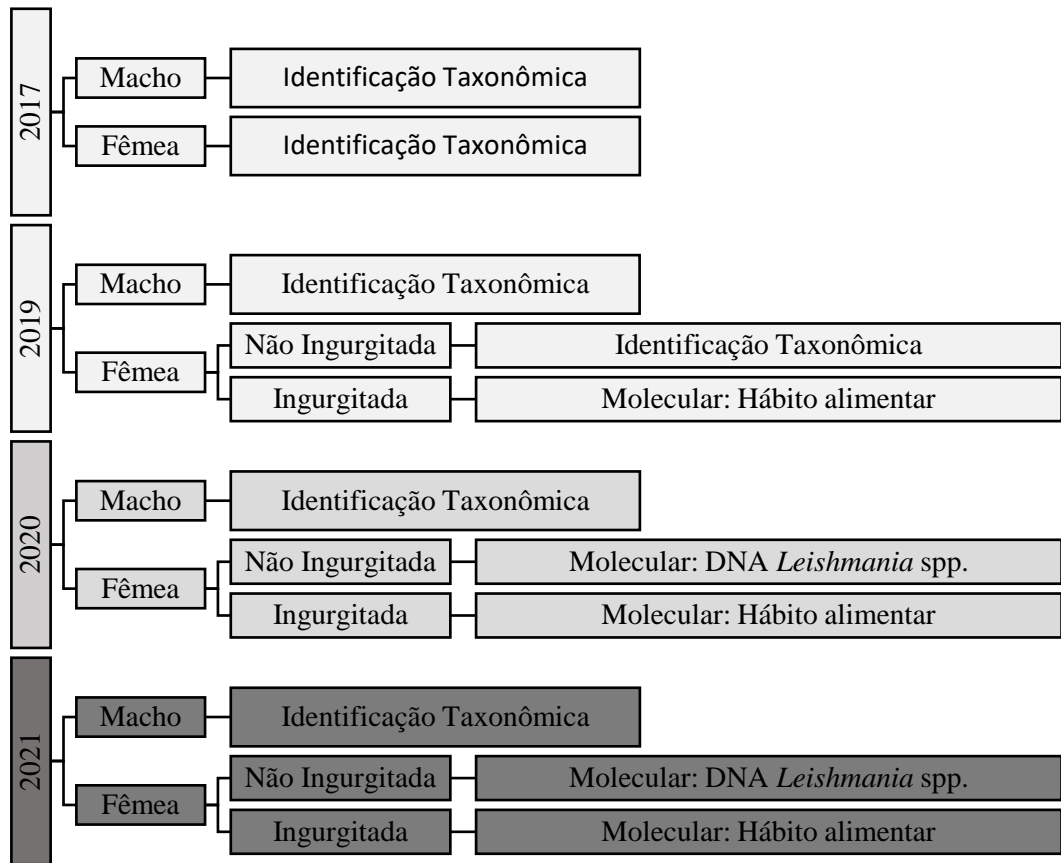
os flebotomíneos dos demais insetos em placa de Petri e acondicionados e fixados em tubos Falcon 15mL contendo álcool 70%, quando então foram transportados para o Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

#### **4.4 Processamento dos espécimes:**

Os espécimes coletados seguiram para diferentes processamentos de acordo com o sexo e ano de coleta. Durante o ano de 2017, anterior à execução deste projeto de doutorado, foram identificados como dados preliminares a fim de se conhecer parte da fauna do Parque Estadual dos Três Picos, sendo assim, todos os espécimes seguiram para a identificação taxonômica.

Os espécimes coletados no ano de 2019, de janeiro a fevereiro, todos os espécimes coletados seguiam diretamente para a identificação taxonômica, seguindo o processo de clarificação e diafanização, exceto as fêmeas ingurgitadas (com sangue no abdômem). Já as fêmeas ingurgitadas do período do ano de 2019 e as demais fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas dos anos de 2020 e 2021 seguiram para o processo de preparo para os métodos moleculares (Figura 6).





**FIGURA 6 FLUXOGRAMA APRESENTANDO O PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES DE CADA ANO.**

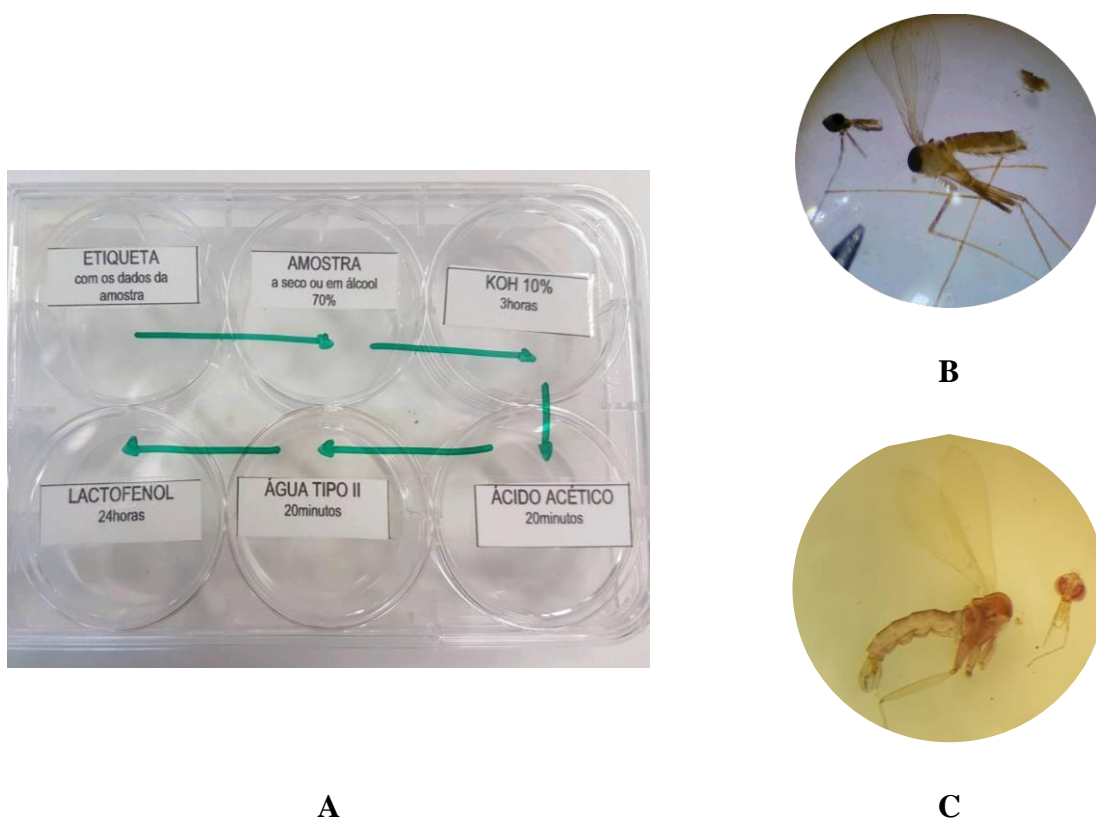
Para os espécimes que seguiram diretamente para a identificação taxonômica o processo foi iniciado com potassa a 10% (KOH) durante 2-3 horas, em seguida os flebotomíneos ficam imersos em ácido acético por 20 minutos para retirar o excesso de gordura, em seguida lavados em água tipo II por igual período e finalmente permanecem em lactofenol por 24 horas para a diafanização das estruturas utilizadas no diagnóstico das espécies (59).

Sendo assim, foi realizada a segmentação da cabeça e dos dois últimos segmentos, sendo esses submetidos ao processo de clarificação e diafanização, e o restante da parte do corpo foi armazenada em freezer para posteriormente seguir para o processo de avaliação molecular do hábito alimentar para as fêmeas ingurgitadas e parte das fêmeas.

Já os espécimes fêmeas que seguiram para os métodos moleculares de hábito alimentar e identificação do DNA de *Leishmania* spp., era realizado a segmentação da cabeça e dos dois últimos segmentos do abdômem, que seguiam para o processamento de

clarificação e diafanização, sendo posteriormente identificado taxonomicamente, e a demais parte do corpo armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$  para seguirmos para os métodos moleculares.

No processo de clarificação e diafanização da cabeça e dos dois últimos segmentos a etapa da potassa a 10% (KOH) foi adaptada para apenas 30 minutos em exposição ao produto, mantendo posteriormente apenas a etapa do ácido acético por 20 minutos e em seguida, o lactofenol por aproximadamente 12 horas. Por fim, todos os espécimes machos e fêmeas foram montados entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese com uso de lupa estereoscópica e o diagnóstico específico em microscópio óptico.



**FIGURA 7 PROCESSAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS ONDE A: PLACA DE CULTURA DE CÉLULAS EXEMPLIFICANDO O PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO E DIAFANIZAÇÃO; B: CABEÇA E DOIS ÚLTIMOS SEGMENTOS DA FÊMEA DE FLEBOTOMÍNEO MONTADO EM LÂMINA; C: MACHO DE FLEBOTOMÍNEO MONTADO EM LÂMINA.**

#### **4.5 (59) Diagnóstico das espécies:**

Foi utilizado o microscópio estereoscópico modelo ZEISS para a observação dos caracteres morfológicos taxonômicos, e a identificação foi realizada com o auxílio da

chave dicotômica proposta por Galati (8,9) e as abreviações dos nomes das espécies conforme sugerido por Marcondes (60).

#### **4.6 Análises moleculares:**

##### **Hábito alimentar:**

A identificação do conteúdo intestinal de sangue de fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas foi realizada por análise baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene do citocromo B (cyt b), usando primers previamente descritos, seguido de sequenciamento do produto de 383 pb. DNA extraído de flebotomíneos machos foi usado como controle negativo e DNA de *Lu. longipalpis* previamente alimentadas com sangue de coelho (inativado a 56°C) serviu como controle positivo para as reações de amplificação.

Para ambas as análises de detecção de DNA de *Leishmania* e fonte alimentar, DNA purificado ou produtos amplificados de PCR, respectivamente, foram submetidos ao sequenciamento. As reações foram realizadas usando Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems Foster City, EUA) seguindo as especificações do fabricante e ensaiadas no Sanger ABI 3730 Sequencing. As sequências de consenso foram obtidas e editadas usando o pacote de software Phred/Phrap/Consed versão: 0.020425.c (Universidade de Washington, Seattle, EUA) e apenas as sequências com valores de Phred acima de 20 foram usadas como contigs. Os contigs foram montados e alinhados no software MEGA521 e as sequências foram avaliadas contra o banco de dados NCBI nr usando BLASTn.22

##### **Presença de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos**

A metodologia utilizada para a identificação da presença de *Leishmania* spp. foi baseada no artigo de Pita-Pereira *et. al.* (29). Dessa forma, o processamento tem início com a extração de DNA através da incubação dos flebotomíneos agrupados em 100µl de tampão TE (pH 8,0) contendo 100 g/ml de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 2 h a 56°C. Após centrifugação a  $13.000 \times g$ , 4°C por 15 min, o sobrenadante coletado foi aquecido a 95°C por 15 min para inativar a proteinase K. As amostras resultantes foram submetidas à extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os sedimentos de DNA foram ressuspensos em 50µl de tampão 0,1 x TE (pH 8,0). Dez porções de microlitros de extratos de DNA foram usados para amplificação por PCR.

Para evitar possíveis contaminações, por exemplo, a inclusão de grupos de controle negativo (flebotomíneos machos) na etapa de extração de DNA e descontaminação de instrumentos e áreas de trabalho com solução diluída de cloreto e raios UV foram utilizados. O DNA total também foi obtido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, utilizadas como controle positivo. Os parasitos foram colhidos na fase logarítmica tardia e lavados em PBS antes do isolamento do DNA.

Após a lise em tampão TE contendo proteinase K, o DNA foi extraído por precipitação com fenol-clorofórmio e etanol, conforme descrito acima para as amostras de insetos.

#### **4.5.2 Procedimento multiplex de PCR de inicialização a quente**

Para o ensaio de PCR multiplex, foram utilizados dois pares de primers. Os iniciadores [5-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3 e 5-GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3] foram empregados para amplificar a região conservada do DNA do minicírculo do cinetoplástico de *Leishmania* spp.(61). O segundo par de primers amplifica a região IVS6 do gene da cacofonia em flebotomíneos do gênero neotropical *Lutzomyia*: 5L1cac [5-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3] e 3L1cac [5-CCACGAACAAGTTCA ACATC-3](62). As reações foram realizadas em um volume

final de 100µl contendo 1x tampão de polimerase Taq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 4,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 M de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 M de cada primer, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems) e 10 L de amostra de DNA. A mistura foi incubada em termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a 94 °C por 12 min para ativação enzimática (PCR hot-start), seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. Após o último ciclo, a extensão foi continuada por mais 10 minutos a 72 °C. Dez microlitros do produto da reação de amplificação foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob transiluminação UV.

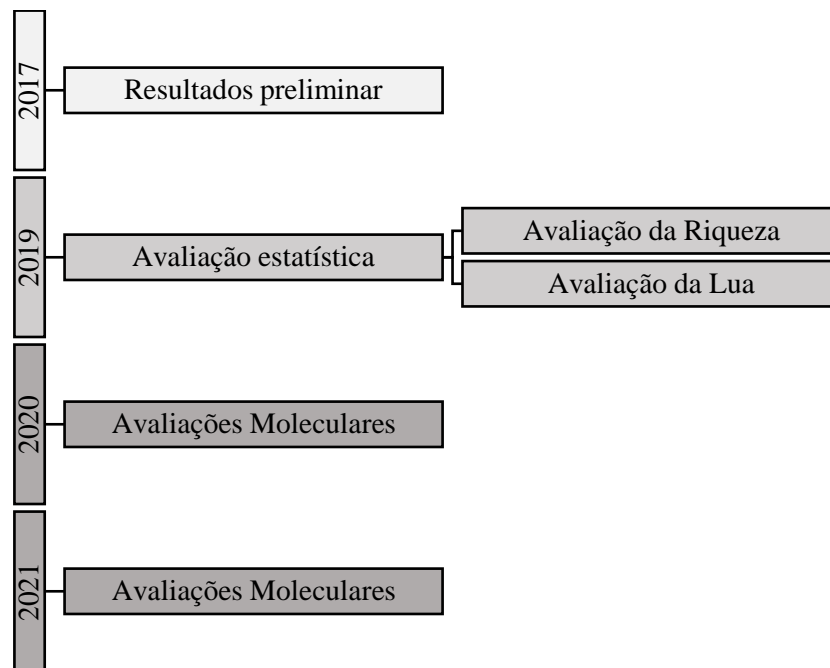
#### **4.5.3 Análise de dot blot para detectar infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos**

Os produtos amplificados também foram analisados por hibridização dot blot usando uma sonda biotinilada específica de *L. (Viannia) spp.* [5: TAATTGTGCACGGGGAGGCCA] (63). Resumidamente, os produtos amplificados (10µl) foram desnaturados em 0,4N NaOH antes da aplicação em membranas de nylon (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha), usando um dispositivo de vácuo múltiplo (Bio-Dot™; BioRad, Richmond, CA, EUA). Após a adição da sonda biotinilada (5 ng/ml), as reações de hibridização foram realizadas durante a noite a 46 °C em BLOTTO (1,5 × solução salina—sódio—tampão de citrato contendo 1% de dodecilsulfato de sódio, 0,5% de leite desnatado). Os filtros foram lavados cinco vezes usando 0,05% Tween-20 (BioRad) em PBS-Tween-20, a 25°C por 5 min cada, antes da incubação com um conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído 1:100 (Sigma, St Louis, MO, EUA) no mesmo buffer a 25°C por 1 h. As membranas foram então lavadas cinco vezes com PBS-Tween-20, cada vez por 5 min a 25°C, antes de serem equilibradas com tampão de detecção (0,5 mM citrato-tampão fosfato pH 5). As reações de hibridização foram reveladas com a adição de 2% de diaminobenzidina (DAB; Sigma) e 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA).

#### **Análise Estatística**

Para demonstração da fauna apresentada nas coletas preliminares à execução deste projeto, foi realizada uma breve análise descritiva dos flebotomíneos capturados no período de agosto, setembro e novembro de 2017.

A fim de não estabelecer um viés na análise estatística de forma a manter os períodos seco e chuvoso igualmente contemplados, optou-se por avaliar os dados coletados no período de janeiro de 2019 a dezembro de 2019 separadamente e os resultados pontuais realizados em janeiro e fevereiro de 2020, agosto e setembro de 2021 utilizados apenas para as análises moleculares.



**FIGURA 8 FLUXOGRAMA DAS AVALIAÇÕES REALIZADAS COM OS ESPÉCIMES COLETADOS EM CADA ANO.**

Para estimar a riqueza do parque, o software EstimateS 8.2.0 foi utilizado para calcular os estimadores não paramétricos Chao 2 e Jackknif 1 (64). Sendo o estimador Chao 2 um estimador de riqueza baseado na incidência de espécies, calculado pela fórmula(64):

$$S_2 = S_{obs} + \frac{Q_1^2}{2Q_2}$$

E o estimador Jackniff 1 estimador de riqueza baseado na abundância, calculado pela fórmula (64):

$$S_{jack1} = S_{obs} + Q_1 \left( \frac{m-1}{m} \right)$$

Além desses estimadores, foram calculadas as curvas de rarefação que representam a riqueza das espécies observadas na amostra, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

Para avaliar a abundância de espécies, estão sendo utilizados os seguintes testes estatísticos, o “Índice de Abundância de Espécies” (ISA) e o “Índice de Abundância de Espécies” (SISA) (65).

O programa Excel foi utilizado para a estatística descritiva dos dados, sendo elaborado gráficos de e de barra para as espécies e gêneros capturados.

#### **4.6.1 Análise da Diversidade:**

Para comparar o número total de flebotomíneos capturados nas diferentes estações de monitoramento utilizamos o software DivEs - Diversidade de Espécies DE4 (66), e os dados analisados através do índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H), índice foi apropriado para amostras aleatórias de espécies de uma comunidade ou sub-comunidade de interesse estimado através da seguinte equação:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \times \log(b)p_i$$

A fim de estimar a dominância de espécie nas estações de monitoramento, foi utilizado o teste estatístico do índice de diversidade de Simpson. Determinado pela equação:

$$D_s = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n n_i \times (n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

A equidade, índice que demonstra a região onde há o maior número de espécimes distribuídas proporcionalmente iguais pelas espécies identificadas, sendo proporcional à diversidade e inversamente proporcional a dominância. A medida de equidade ou equitabilidade, compara a diversidade de Shannon-Wiener com a distribuição das espécies observadas que maximiza a diversidade. Sendo determinada através do índice de Equidade J (Pielou) calculado pela fórmula:

$$J = \frac{H'}{H'_{max}}$$

E, para estimar a riqueza de espécies por estação de monitoramento, foi utilizado o índice de riqueza das espécies Jackknife 1ª ordem (J) estimado através da seguinte equação:

$$E_D = S_{obs} + s_1 \left( \frac{f - 1}{1} \right)$$

A comparação das diversidades das estações de monitoramento foi realizada segundo o teste t para H' a 5% de probabilidade, para isso se faz necessário para comparar a diversidade de Shannon de duas coleções de dados ou dois levantamentos ou amostras (H'1 e H'2), é necessário calcular a variância para cada diversidade, assim como é feito para a diversidade de Simpson(67), mas com a seguinte equação:



$$s^2 = \frac{\sum n_i \times \log_b^2 \times n_i - \frac{(\sum n_i \times \log_b \times n_i)^2}{N}}{N^2}$$

Seguido da equação:

$$t = \frac{|H'_1 - H'_2|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}$$

E, por fim, para comparação com a tabela do teste *t-student* o grau de liberdade em valor arredondado é dado pela seguinte equação:

$$GL = \frac{(s_{H'_1} + s_{H'_2})^2}{\frac{(s_{H'_1})^2}{n_1} + \frac{(s_{H'_2})^2}{n_2}}$$

#### **4.6.2 Avaliação da frequência de flebotomíneos quanto às fases da Lua:**

**Para comparar o número total de flebotomíneos capturados nas diferentes fases da lua também utilizamos o software DivEs - Diversidade de Espécies DE4, e os dados analisados através do índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H) e o índice de Riqueza da Espécies (J) (66). Foi realizado também uma correlação da proporção de machos e fêmeas capturados nas fases lunares, bem como foi realizado uma estatística descritiva utilizando o programa Excel.Mapas Temáticos:**

Os índices de cobertura florestal foram estimados manualmente usando o software QGis 3.22.7. Uma imagem de satélite Landsat 7 (a partir de 2002) baixada da plataforma Geological Survey dos Estados Unidos "LandsatLook" (<http://landsatlook.usgs.gov/viewer.html>) foi utilizada para delinear os polígonos da cobertura florestal. A resolução da imagem foi de 30 metros para bandas de 1 a 7 e 15 metros para a banda oito. As faixas foram fundidas resultando em uma imagem final de 15 metros de resolução.

A composição das comunidades de flebotomíneos foi avaliada a partir de escalonamento multidimensional (MDS). MDS é um método para medir a semelhança entre conjuntos de dados, que neste estudo se refere à composição das populações de Phlebotominae (conjuntos de dados) em cada unidade de amostragem. Para a estruturação e análise dos bancos de dados foram utilizados os programas Microsoft Excel e SPSS 23.

### Resultados:**Limitações do estudo:**

Alguns imprevistos à execução deste projeto foram observados e refletiram em alterações às análises previstas para o estudo. O principal imprevisto ocorrido foi a pandemia do COVID-19 durante o período de coletas de campo. Dessa forma, houve apenas um ano e dois meses de capturas devido ao período de *stop work* realizado em função do avanço dos casos de COVID-19 no estado do Rio de Janeiro e determinações de *lockdown* pelas frentes de saúde do estado.

Uma vez que a programação inicial do projeto previa a separação das fêmeas não ingurgitadas a partir do segundo ano de coleta, a fim de primeiramente conhecer a fauna flebotomínica da região sem haver dúvidas taxonômicas nas fêmeas separadas para a avaliação molecular, com a paralização das atividades presenciais estabelecido em função da pandemia do COVID-19, apenas os meses de janeiro e fevereiro de 2020 contemplaram as avaliações de fêmeas não ingurgitadas para a avaliação de presença de DNA de *Leishmania* spp. sem a presença de sangue no trato digestivo dessas.

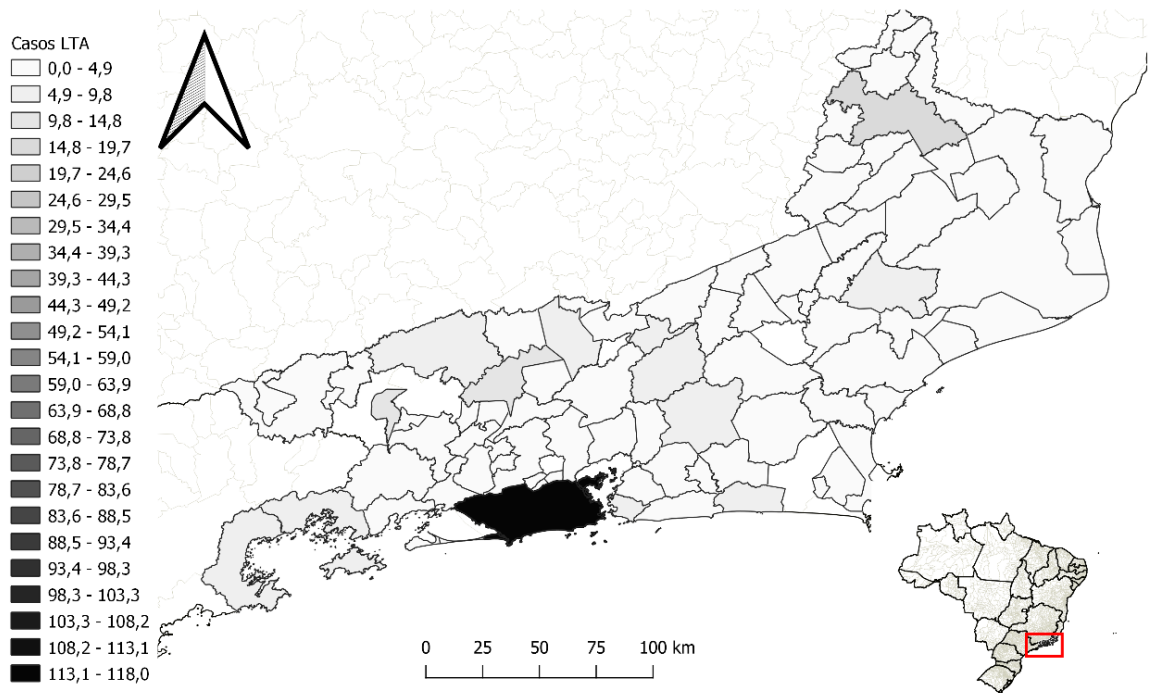
Outra importante alteração pode ser observada nas análises estatísticas, das quais, devido ao período de paralização, apenas as capturas do ano de 2019 seguiram a programação de períodos seco e chuvoso, bem como as fases da lua. Sendo assim, ainda que não tenha sido possível realizar uma análise ambiental estatisticamente robusta, devido a inviabilização de mais um ano de capturas em função da pandemia da Covid-19, pode-se apontar comparações entre as estações de monitoramento (EM's) bem como entre as fases da lua.

Por fim, outro fator pode ter influenciado as análises moleculares do estudo, uma vez que o resultado indeterminado de algumas análises pode se justificar pela pouca quantidade de sangue bem como o excesso de ovos já no abdômen destas fêmeas, contudo, podem ainda ser justificado pela sequência encontrada não ter sido depositada ainda nos bancos de dados usados como base (PubMed).

### **Revisão epidemiológica do estado do Rio de Janeiro**

Após uma revisão da situação epidemiológica do estado do Rio de Janeiro para Leishmaniose Tegumentar Americana no período de 2015 a 2020, observou-se segundo

os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) que o estado do Rio de Janeiro, como um estado endêmico para este agravo, apresentou pelo menos um caso de LTA em pelo menos metade do estado, tendo como positivo 45 municípios em um total de 84. Dentre esses municípios, a capital do estado se destacou com o maior número de casos notificados (Figura 9).

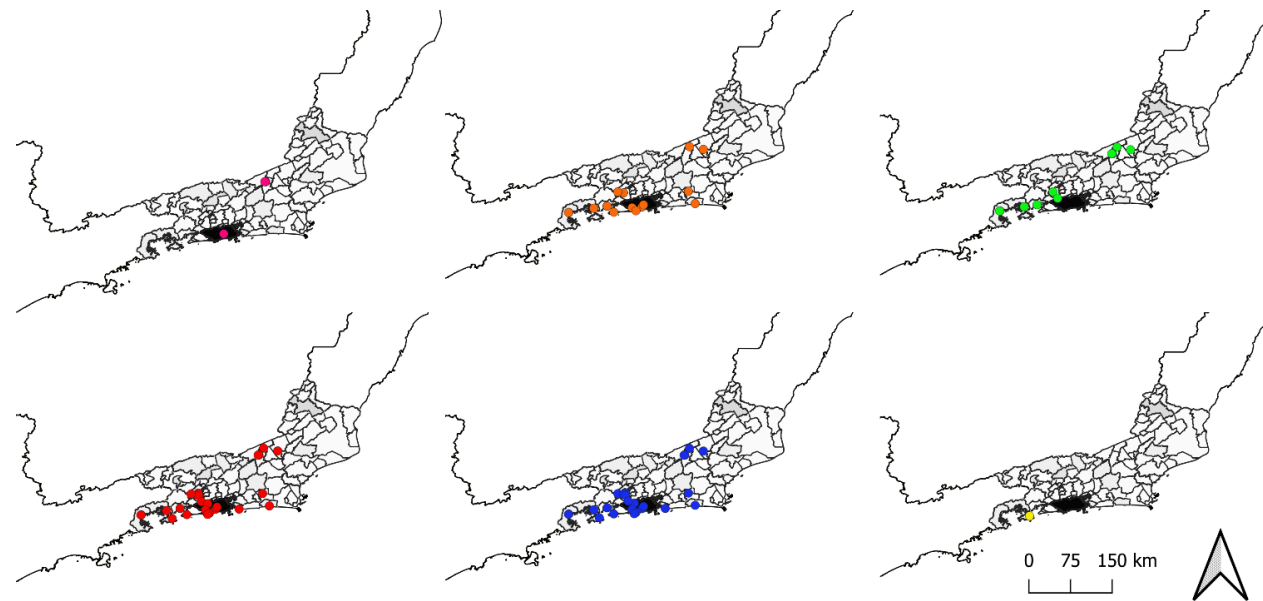


**FIGURA 9 CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DISTRIBUÍDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO DURANTE O PERÍODO DE 2015 A 2020, SEGUNDO DADOS DO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN)**

Destaca-se ainda nesta distribuição que o município de Cachoeiras de Macacu, município o qual o estudo teve foco na captura de dados preliminares, apresentou a notificação de 7 casos de LTA neste período, sendo assim, o nono município do estado a apresentar mais casos de LTA no Rio de Janeiro.

Segundo dados compilados no banco de dados a partir de revisões bibliográficas, a fim de complementar a revisão de notificação de espécies de flebotomíneos distribuídas no estado do Rio de Janeiro desenvolvida por Carvalho *et. al.* (19), 51 espécies distribuídas em 13 gêneros foram encontradas em todo o estado do Rio de Janeiro durante o período de 2015 a 2022. Esses resultados foram obtidos a partir de 17 estudos encontrados nas bases de dados utilizadas nesta revisão, nos permitindo assim apontar os municípios de encontro de cada espécie (Anexo 4).

Além desta distribuição de todas as espécies identificadas no estado, realizamos também a análise geoespacial correlacionando os casos notificados de LTA por município durante o período de 2015 a 2020 com o encontro das espécies confirmadas e espécies vetoras de *Leishmania braziliensis* no estado (Figura 10). Nesta análise pode-se observar que a maioria dos municípios que possuem casos notificados não possuem a distribuição de seus vetores ainda estudado.



**Espécies:**

- *Psychodopygus hirsuta hirsuta*
- *Pintomyia fisheri*
- *Nyssomyia whitmani*
- *Nyssomyia intermedia*
- *Migonemyia migonei*
- *Bichromomyia flaviscutellata*

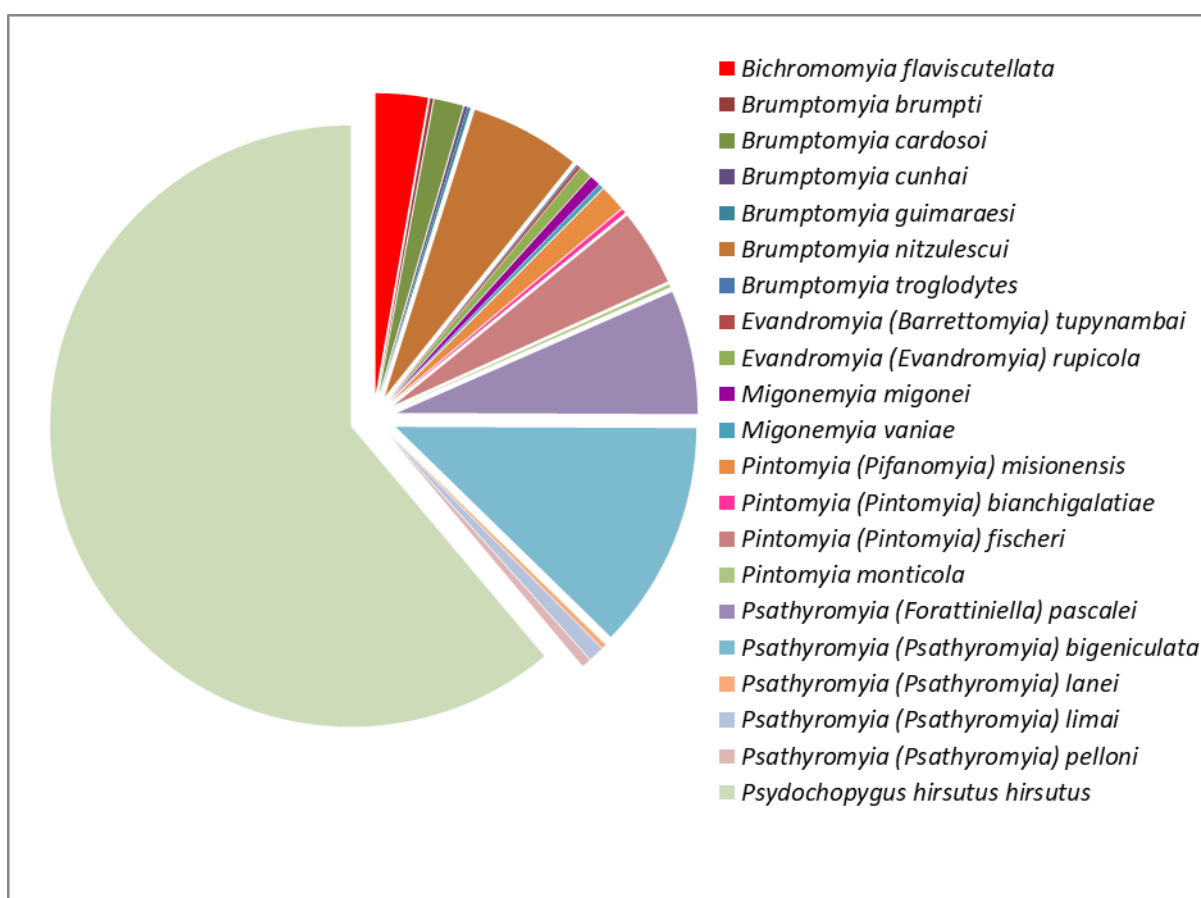
**Casos LTA**

- 0,0 - 4,9
- 4,9 - 9,8
- 9,8 - 14,8
- 14,8 - 19,7
- 113,1 - 118,0

**FIGURA 10 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES VETORAS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: *NYSSOMYIA WHITMANI*, *NYSSOMYIA INTERMEDIA*, *MIGONEMYIA MIGONEI* E *BICHROMOMYIA FLAVISCUTELLATA*; E ESPÉCIES SUSPEITAS DE SEREM VETORAS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: *PSYCHODOPYGUS HIRSUTUS HIRSUTUS* E *PINTOMYIA FISHERI* CORRELACIONADO COM A DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE LTA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

## Os flebotomíneos do Parque Estadual dos Três Picos.

Visando levantar dados preliminares da fauna e avaliar a região para a execução do projeto, extraiu-se uma amostra de três meses de coleta no ano de 2017. Dentro deste período foram contabilizados 353 flebotomíneos distribuídos dentre 21 espécies identificadas (Figura 11).

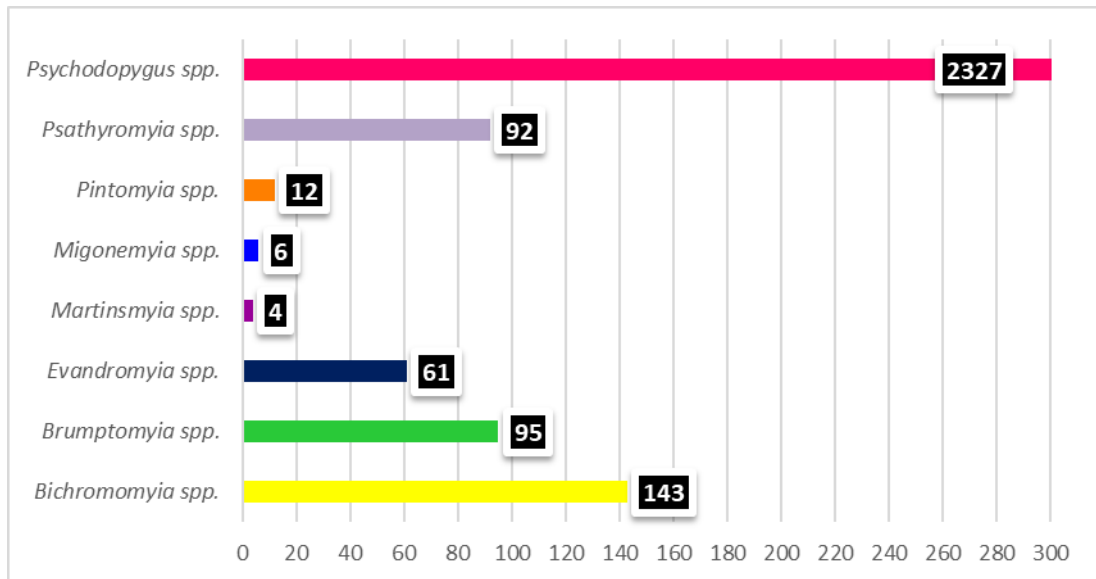


**FIGURA 11 DADOS PRELIMINARES DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADAS NO PERÍODO DE AGOSTO, SETEMBRO E NOVEMBRO DE 2017, NA SEDE DO JEQUITIBÁ DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS.**

Foram capturados três espécimes da espécie *Migonemyia vaniae*, a qual não havia sido registrada anteriormente no estado do Rio de Janeiro. Este dado deu origem ao artigo

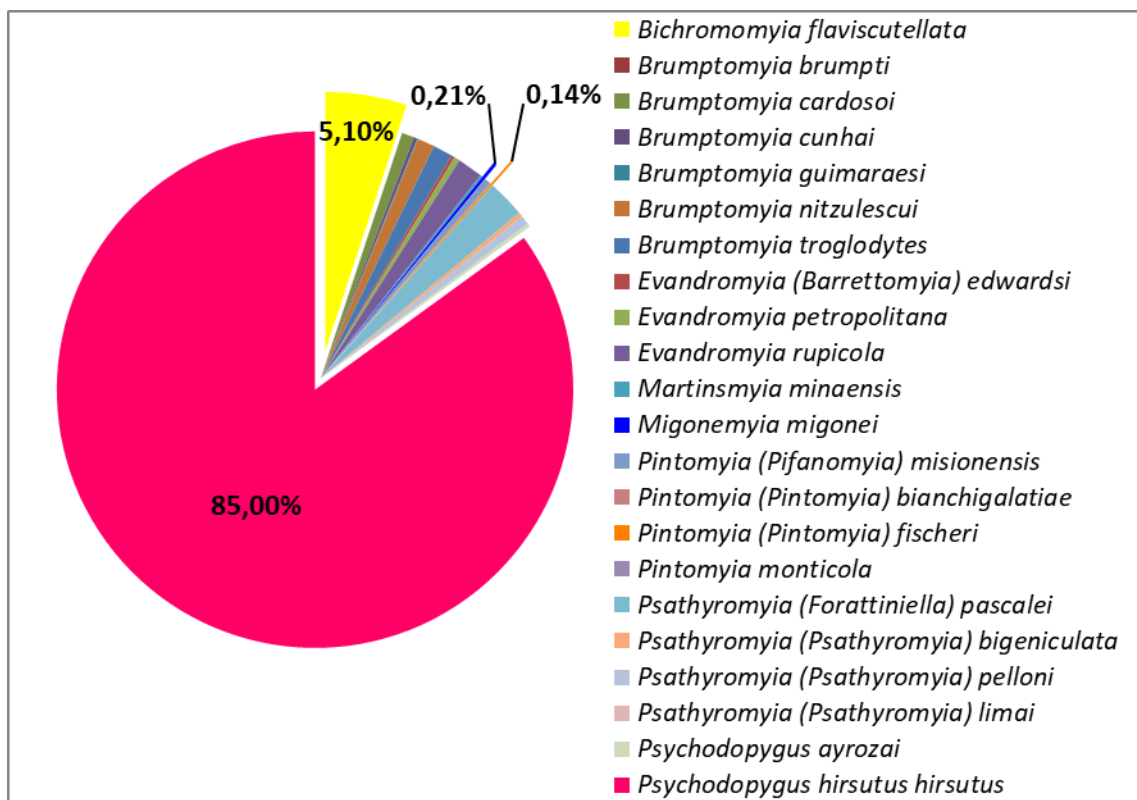
“First record of *Migonemyia vaniae* (Galati, Fonseca & Marassá, 2007) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the state of Rio de Janeiro, Brazil” (Anexo 1).

Com o início do desenvolvimento do projeto, após 12 meses de captura durante o ano de 2019, foram capturados 2.826 espécimes e distribuídos em 8 gêneros identificados (Figura 12), dos quais o gênero *Psychodopygus*, respondeu por mais da metade dos espécimes capturados (2.327 espécimes) apresentando-se mais frequente em todo o estudo, seguido do gênero *Bichromomyia* (143 espécimes) (Figura 13).



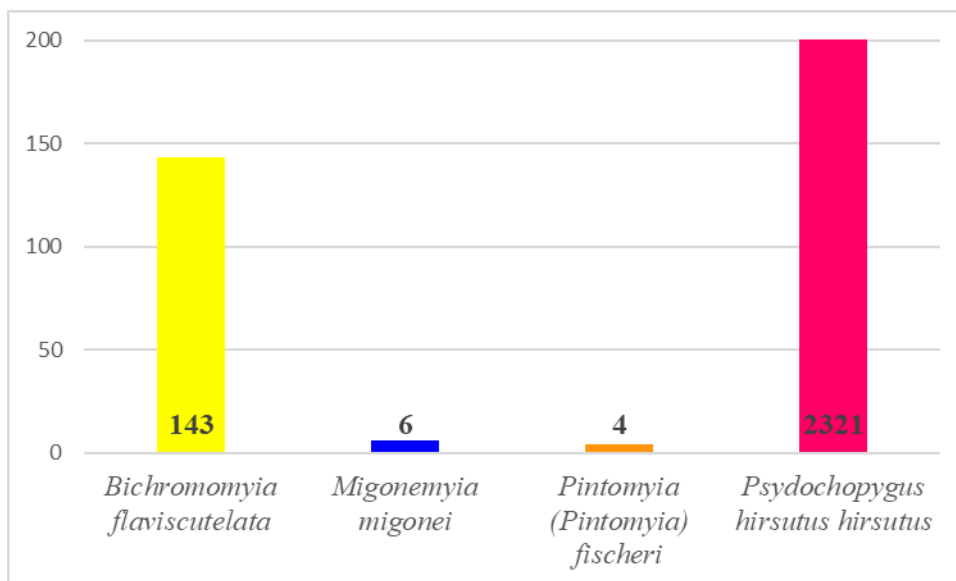
**FIGURA 12 DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES CAPTURADOS NOS GÊNEROS IDENTIFICADOS DURANTE O PERÍODO DE JANEIRO A DEZEMBRO DE 2019.**





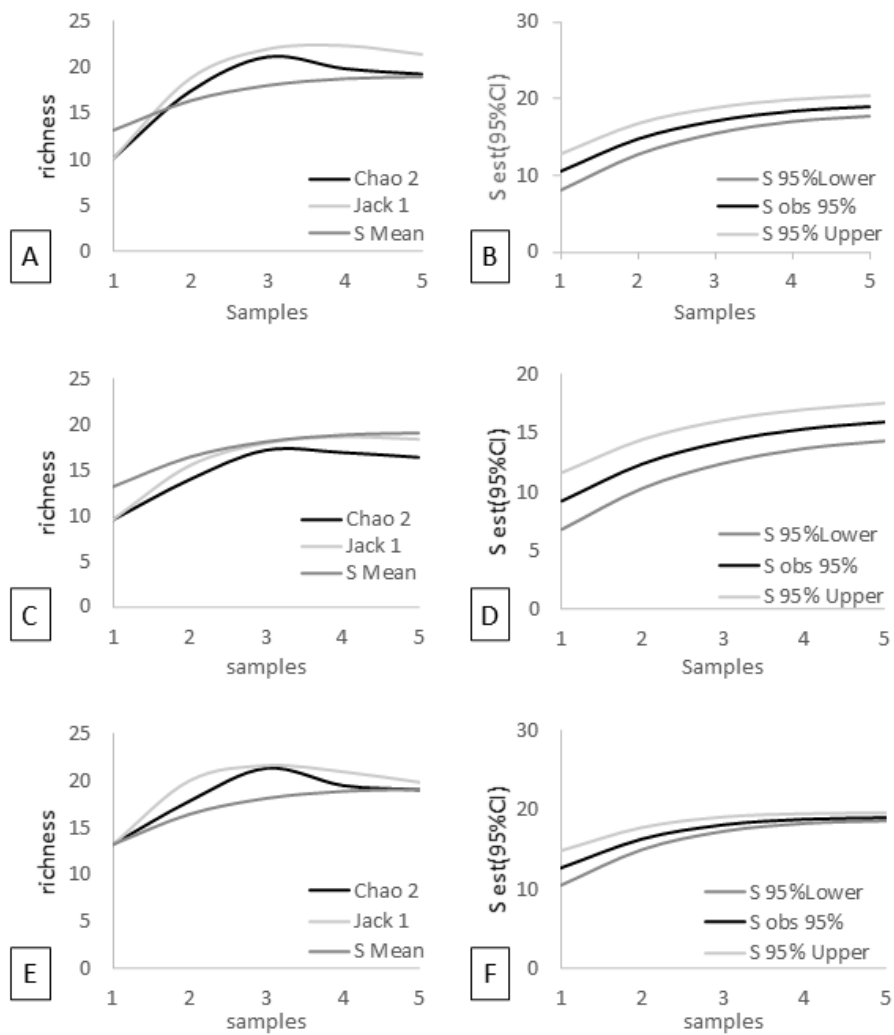
**FIGURA 13 DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES CAPTURADOS NAS ESPÉCIES CAPTURADAS E IDENTIFICADAS DURANTE O PERÍODO DE JANEIRO A DEZEMBRO DE 2019, DESTACANDO-SE A PORCENTAGEM DAS ESPÉCIES DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA.**

Dentre essas espécies podemos destacar a presença de quatro que possuem importância médica e veterinária segundo a literatura: *Migonemyia migonei* (6 espécimes) e *Pintomyia (Pintomyia) fisheri* (4 espécimes), bem como as espécies já mencionadas *Bi. flaviscutellata* (143 espécimes) e *Ps. hirsutus hirsutus* (2402 espécimes), sendo esta última a mais dominante no estudo (Figura 14).



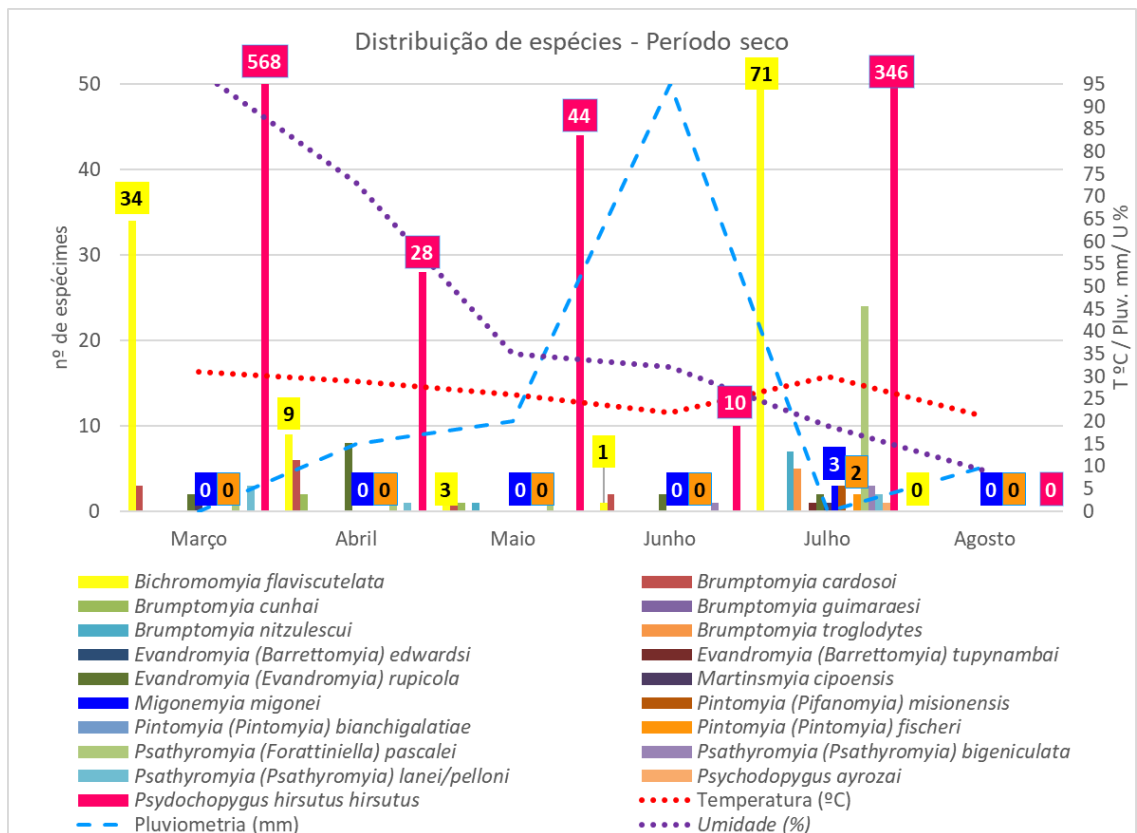
**FIGURA 14** ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA CAPTURADAS NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS NO PERÍODO DE JANEIRO A DEZEMBRO DE 2019.

Ainda que observado uma riqueza significativa ao final de um ano de capturas, com 22 espécies identificadas, nossos dados apontam que esta riqueza de espécies pode ser ainda maior. As curvas de rarefação que representam a riqueza de espécies observada nos períodos chuvoso (Figura 15, A e B), seco (Figura 15, C e D) e no período total do estudo (Figura 15, E e F) mostraram uma estabilização da curva, de acordo com todos os indicadores não paramétricos utilizados (Figura 15). Os dados deste levantamento foram apresentados no manuscrito submetido com o título: “First entomological survey of sand flies (Diptera: Psychodidae) in an ecological visitation park in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, and the presence of *Leishmania braziliensis*” (**Anexo 2**).

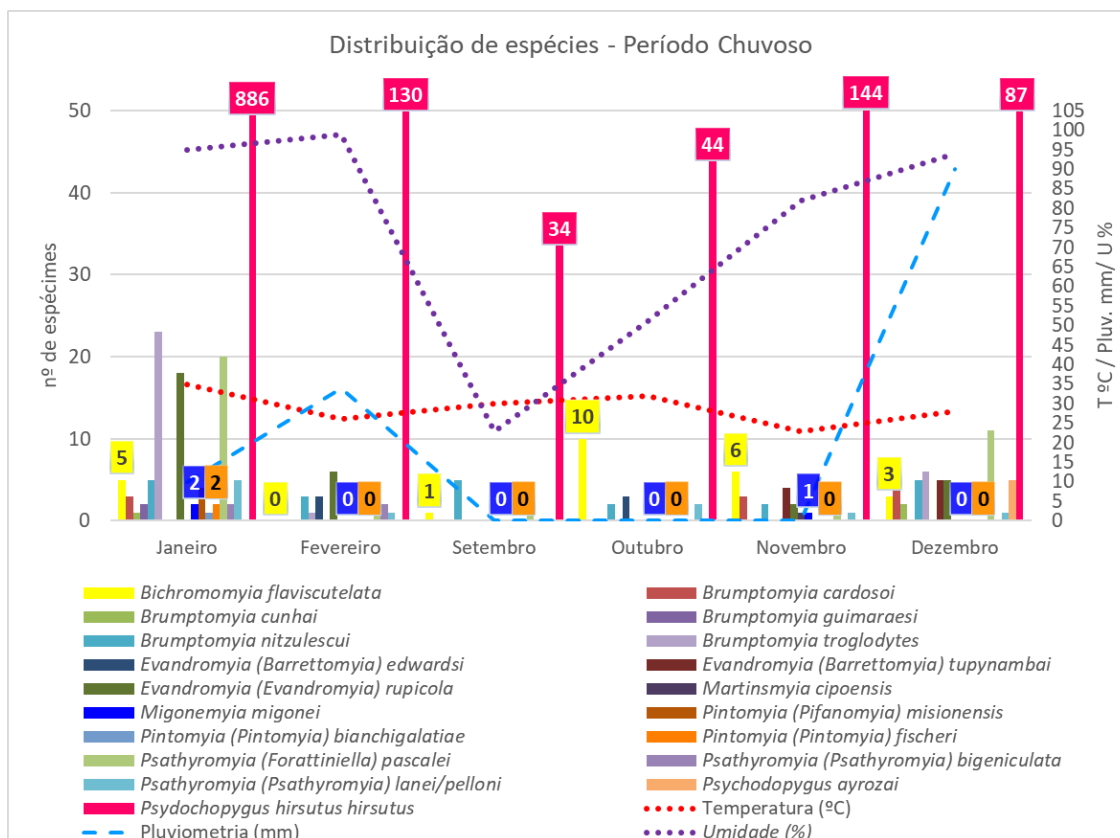


**FIGURA 15 CURVAS DA RIQUEZA DE ESPÉCIES ESTIMADA, SENDO “A” DA ESTAÇÃO CHUVOSA, “C” DA ESTAÇÃO SECA E “E” REPRESENTANDO O TOTAL DO ESTUDO. E CURVAS DE RAREFAÇÃO QUE REPRESENTAM A RIQUEZA DE ESPÉCIES OBSERVADA DE FLEBÓTOMOS CAPTURADOS NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS, CACHOEIRAS DE MACACU, RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL, DE JANEIRO A DEZEMBRO DE 2019, COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%, CONSIDERANDO O MESMO TAMANHO DE AMOSTRA. SENDO “B” PARA ESTAÇÃO CHUVOSA, “D” PARA ESTAÇÃO SECA E “F” REPRESENTANDO O TOTAL DO ESTUDO.**

A espécie *Ps. hirsutus hirsutus* foi dominante não só em todo estudo, mas também dominante em todos os meses de captura (Figura 16 Figura 17). Observa-se ainda que a espécie *Bi. flaviscutellata* apresentou seus maiores índices de densidade apenas em dois meses específicos (março e julho), sendo a segunda espécie mais frequente nestes meses.



**FIGURA 16 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES IDENTIFICADAS NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS NOS MESES QUE FAZEM PARTE DO PERÍODO SECO DO ANO DE 2019, ASSOCIADOS AOS ÍNDICES PLUVIOMÉTRICOS, DE TEMPERATURA E DE UMIDADE.**



**FIGURA 17 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES IDENTIFICADAS NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS NOS MESES QUE FAZEM PARTE DO PERÍODO CHUVOSO DO ANO DE 2019, ASSOCIADOS AOS ÍNDICES PLUVIOMÉTRICOS, DE TEMPERATURA E DE UMIDADE.**

A maior densidade da espécie *Bi. flaviscutellata* pode ser observada quando realizada a análise da distribuição periódica das espécies associadas às medições de temperatura e de pluviosidade mensais, estando suas maiores densidades nos meses de março com 34 espécimes capturados e julho, com 71 espécimes capturados (Figura 16Figura 17). Esses meses apresentaram os níveis mais elevados de pluviosidade do que nos meses imediatamente anteriores (fevereiro e junho). No mês de fevereiro o índice pluviométrico registrado foi 34 mm e em junho 95 mm (Figura 16Figura 17).

Já para a espécie *Ps. hirsutus hirsutus* pode-se observar um padrão de dominância mais elevado nos meses de temperaturas mais elevadas, onde no mês de janeiro foi registrada a maior temperatura do estudo (35°C), e de maior dominância da espécie ao longo do ano, sendo capturados 886 espécimes da espécie (Figura 17). Podemos observar que a umidade influenciou na densidade mensal da espécie, concentrando-se nos meses

de maior umidade acumulada, porém, não sendo observado um padrão da pluviosidade influenciando na atividade da espécie (Figura 16Figura 17).

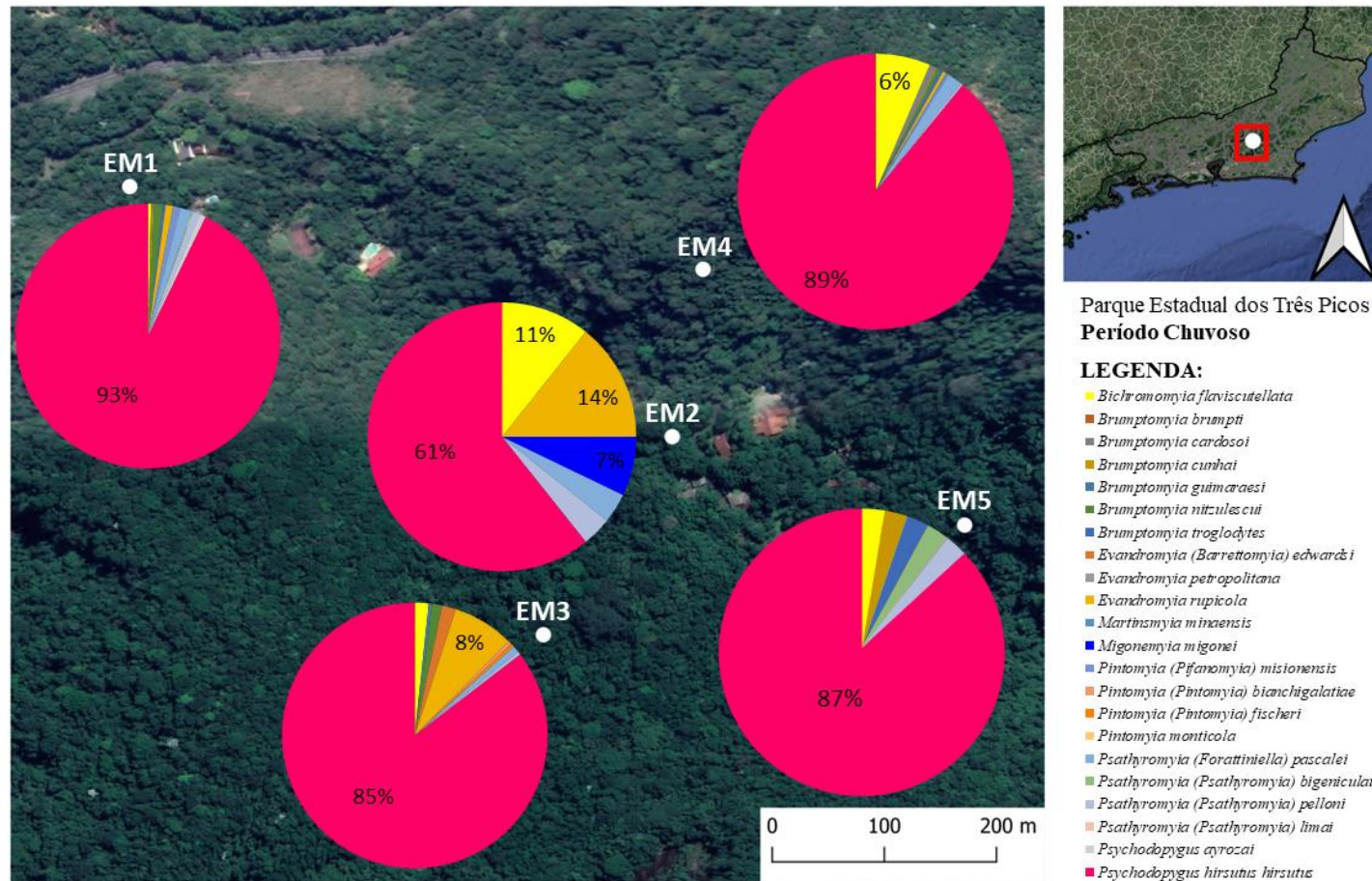
As demais espécies foram capturadas em baixa densidade ao longo do ano, o que não possibilitou se estabelecer ainda um padrão de variação mensal, como pôde ser visto com a espécie *Psychodopygus ayrozai* que apresentou apenas 5 espécimes no período chuvoso (Figura 17). Durante o mês de agosto as capturas foram nulas, isso pode estar relacionado com a mais baixa umidade relativa do ar registrada em todo o estudo, ocupando a 13ª posição no ranking dos índices de abundâncias calculados (ISA e SISA) (Tabela 2).

**TABELA 2 ÍNDICE DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES CAPTURADAS. “INDEX OF SPECIES ABUNDANCE” (ISA), CONVERTIDO EM “STANDARDIZED INDEX OF SPECIES ABUNDANCE” (SISA), NA ESTAÇÃO CHUVOSA, NO PERÍODO SECO E NA COMPOSIÇÃO TOTAL DA ESPÉCIE, SENDO DEFINIDA A POSIÇÃO TOTAL DA ESPÉCIE COM BASE SOBRE O SISA TOTAL.**

ranking		Estação Chuvosa		Estação Seca		Total	
		ISA	SISA	ISA	SISA	ISA	SISA
1	<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>	1	0,95	1,4	0,93	1	0,95
2	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	4,6	0,77	2,1	0,895	3,1	0,845
3	<i>Psathyromyia (Forattiniella) pascalei</i>	7,2	0,64	3,1	0,845	3,2	0,84
4	<i>Evandromyia rupicola</i>	7,5	0,625	5	0,75	4,3	0,785
5	<i>Psathyromyia (Psathyromyia) pelsoni</i>	6,8	0,66	11	0,45	7,6	0,62
6	<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	10,6	0,47	8,5	0,575	8,1	0,595
7	<i>Psathyromyia bigeniculata</i>	13,2	0,34	11,7	0,415	9,3	0,535
8	<i>Brumptomyia troglodytes</i>	10,3	0,485	12,9	0,355	12,1	0,395
9	<i>Pintomyia (Pifanomyia) misionensis</i>	14,7	0,265	13,3	0,335	13,5	0,325
10	<i>Brumptomyia cunhai</i>	14,1	0,295	13,8	0,31	14,1	0,295
11	<i>Brumptomyia cardosoi</i>	15,5	0,225	11,6	0,42	14,2	0,29
12	<i>Martinsmyia minasensis</i>	19,1	0,045	12,7	0,365	14,6	0,27
13	<i>Psychodopygus ayrozai</i>	16,5	0,175	14,6	0,27	14,6	0,27
14	<i>Migonemyia migonei</i>	15,9	0,205	13,4	0,33	14,7	0,265
15	<i>Evandromyia (Barrettomyia) edwardsi</i>	14,9	0,255	#	#	15,6	0,22
16	<i>Evandromyia petropolitana</i>	17,3	0,135	15	0,25	15,6	0,22
17	<i>Pintomyia (Pintomyia) fischeri</i>	16,8	0,16	14,7	0,265	16,7	0,165
18	<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	16,8	0,16	#	#	17,5	0,125
19	<i>Pintomyia (Pintomyia) bianchigalatiae</i>	17,7	0,115	#	#	18,2	0,09

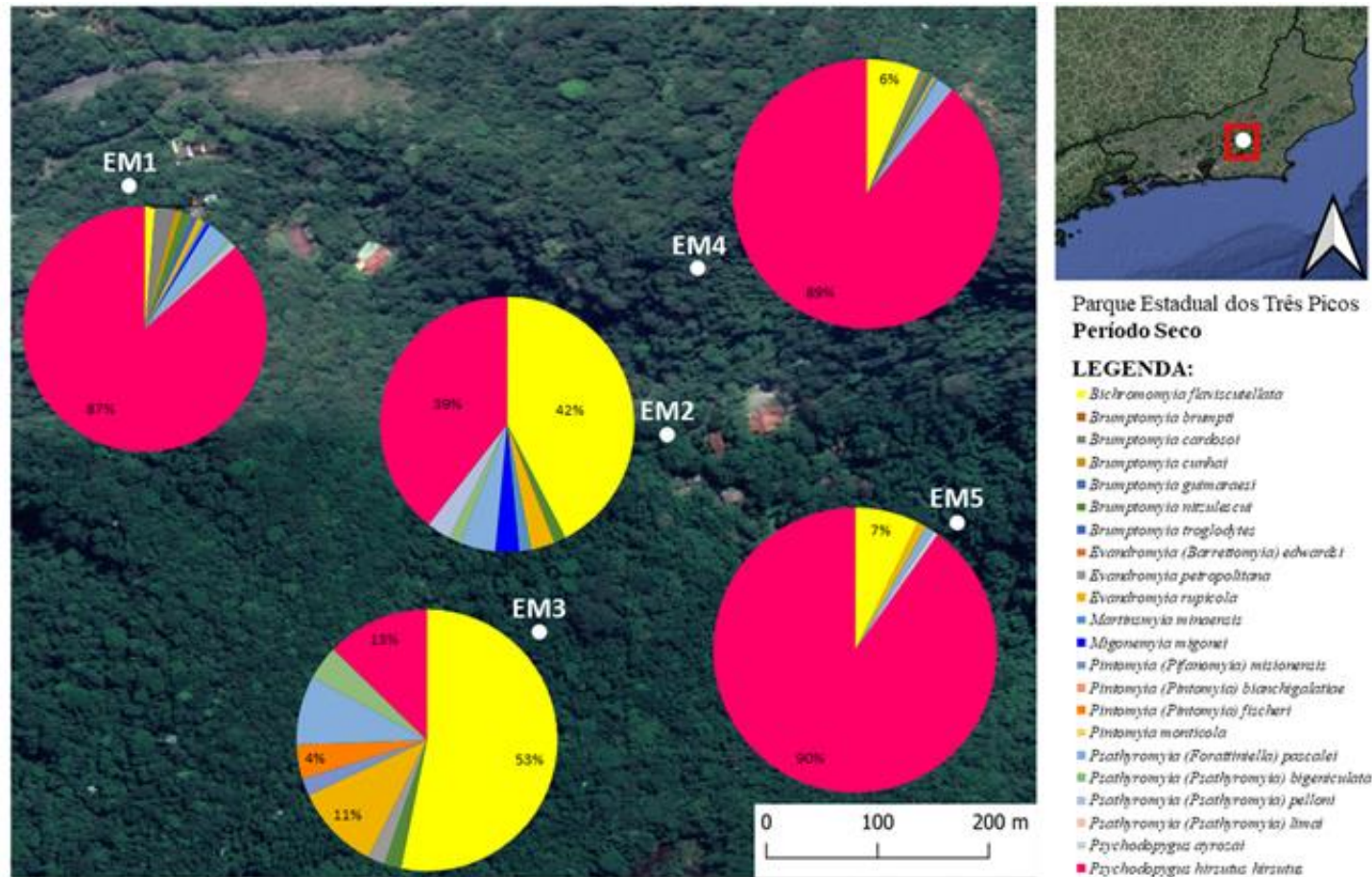
### **Avaliação da diversidade de flebotomíneos:**

A distribuição entre as EM's, separando as coletas entre período seco e período chuvoso (58) onde, dentre as capturas do ano de 2019, os meses de janeiro, fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro compreenderam o período chuvoso e os meses de março até agosto marcaram o período seco. Os dados, associados com as coordenadas geográficas das EM's nos permitiram gerar mapas para os dois períodos com a distribuição georreferenciada das espécies capturadas na sede do Jequitibá do PETP (Figura 18 e 16), possibilitando a comparação visual entre as EM's e entre os períodos seco e chuvoso.



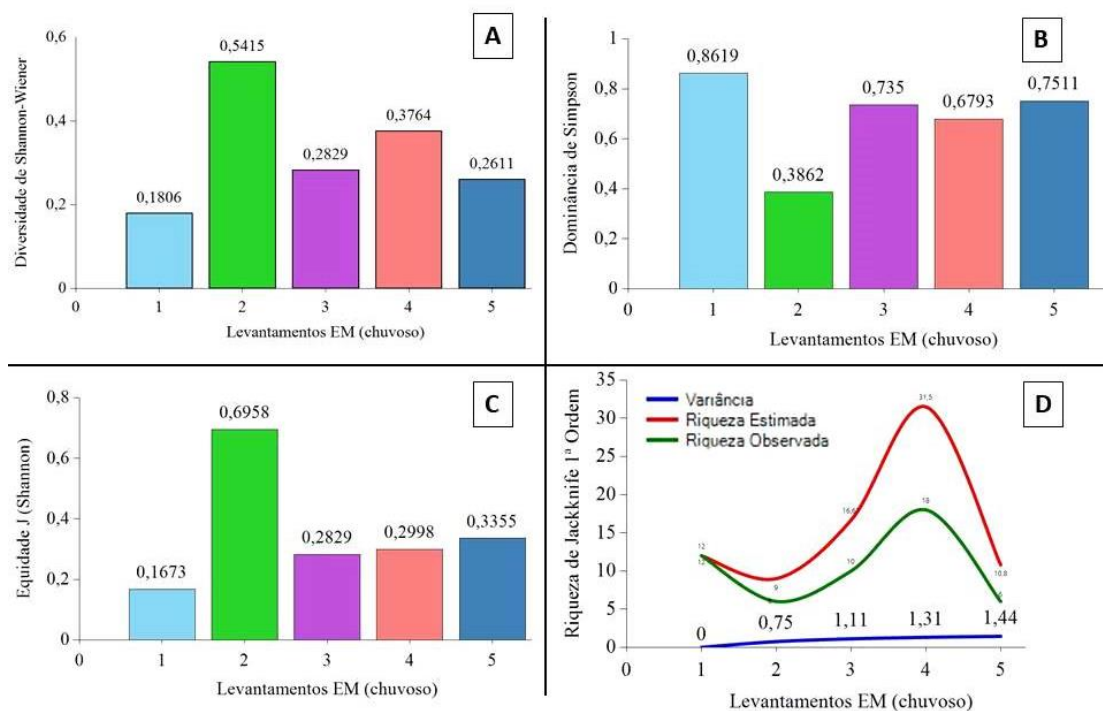
**FIGURA 18** MAPA TEMÁTICO GEORREFERENCIADO DO PERÍODO CHUVOSO, COMPREENDENDO O PERÍODO DE OS MESES DE JANEIRO, FEVEREIRO, SETEMBRO, OUTUBRO, NOVEMBRO E DEZEMBRO, COM A MARCAÇÃO DAS ESTAÇÕES DE MONITORAMENTO EM1 (TRILHA DA ENTRADA); EM2 (TRILHA DOS CRISTÁIS); EM3 (TRILHA DO JEQUITIBÁ); EM4 (TRILHA DOS BICHOS); EM5 (TRILHA DAS ÁGUAS).





**FIGURA 19** MAPA TEMÁTICO GEORREFERENCIADO DO PERÍODO SECO, COMPREENDENDO O PERÍODO DE OS MESES DE MARÇO ATÉ AGOSTO, COM A MARCAÇÃO DAS ESTAÇÕES DE MONITORAMENTO EM1 (TRILHA DA ENTRADA); EM2 (TRILHA DOS CRISTÁIS); EM3 (TRILHA DO JEQUITIBÁ); EM4 (TRILHA DOS BICHOS); EM5 (TRILHA DAS ÁGUAS).

Os resultados apresentados revelam uma ampla diversidade de espécies nas EM's, as quais podem ser relacionadas as características ambientais de cada EM com a variedade de flebotomíneos capturados. Comparando, então, as EM's durante o período chuvoso podemos apontar até o momento a EM2 apresentando a maior diversidade significativamente com valor de 0,5415 no cálculo da diversidade de Shannon-Wiener (Figura 20A). Sendo assim, ao realizarmos o teste *T-student* para verificar a correlação entre as EM's e o grau de significância na comparação do grau de diversidade da EM2 com as demais EM's, pode-se observar que essa comparação não apresenta diferença significativa apenas comparada à EM4 (Tabela 3), sendo o valor da EM4 no cálculo da diversidade de Shannon-Wiener de 0,3764 (Figura 20A).



**FIGURA 20** GRÁFICOS APRESENTANDO OS DADOS ESTATÍSTICOS DO PERÍODO CHUVOSO DE: (A) DIVERSIDADE DE SHANNON-WIENER; (B) DOMINÂNCIA DE SIMPSON; (C) EQUIDADE; (D) RIQUEZA DE JACKKNIFE (1ª ORDEM)

**TABELA 3 TEST T-STUDENT PARA DIVERSIDADE DO PERÍODO CHUVOSO, ASSUMINDO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA P= 0,05 (5% DE PROBABILIDADE). \* HÁ ALTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS DIVERSIDADES, SEGUNDO O TESTE T PARA H' A 5% DE PROBABILIDADE**

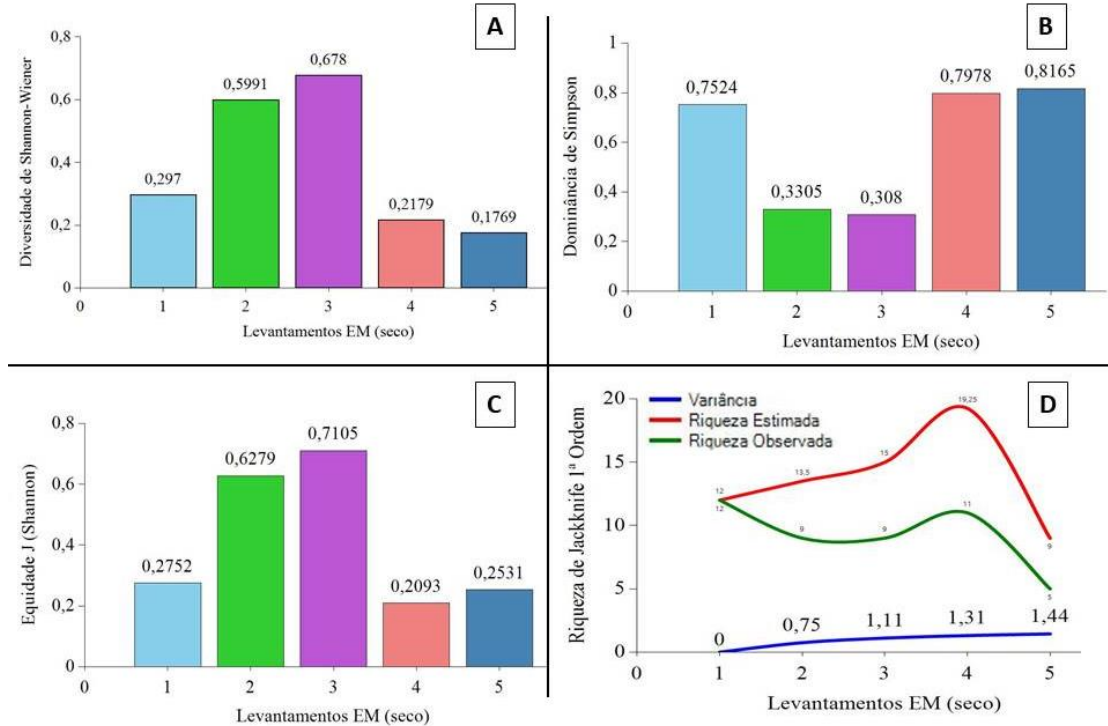
	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5
EM1		4,3127*	2,4342*	5,7981*	0,9326
EM2	4,3127*		2,9399*	1,9579	2,4205*
EM3	2,4342*	2,9399*		2,1601*	0,2413
EM4	5,7981*	1,9579	2,1601*		1,3265
EM5	0,9326	2,4205*	0,2413	1,3265	

Na EM2 pode-se observar uma maior equidade expressa, apresentando o valor de 0,6958 na equidade J de Shannon (Figura 20C). Esses valores podem ser observados no mapa A (Figura 18), onde a EM2 demonstra um maior quantitativo de espécies com a distribuição dos seus espécimes mais uniformemente. Além disso, pode-se observar neste mesmo mapa (Figura 18), uma maior percentagem de flebotômíneos da espécie *Mg. migonei* (11% do total de espécimes do período chuvoso na EM2) se comparado com as demais EM's durante este período. E, ainda nas EM2 e EM3 desse período pode-se observar a presença da espécie *Evandromyia rupicola*.

Ainda no período chuvoso, pode-se observar uma alta dominância significativa semelhante nas estações de monitoramento EM1, EM3, EM4 e EM5 com os valores de 0,8619; 0,735; 0,6793; 0,7511 respectivamente no índice de dominância de Simpson (Figura 20B). Todos os altos graus de dominância se explicam pela alta porcentagem da espécie *Ps. hirsutus hirsutus*, apresentando 93% na EM1, 85% na EM3, 82% na EM4 e 87% na EM5, como observado no mapa A (Figura 18). Além disso, a EM4 apresentou o maior índice de riqueza do estudo (Figura 20D), ou seja, apresentou a maior variedade de espécies presente no período chuvoso.

Já no período seco pode-se observar uma maior diversidade na EM3 de 0,678, significativamente semelhante a EM2 de 0,5991 (Figura 21A) quando comparadas utilizando o teste T-student (Tabela 4), sendo as EM's que apresentam o maior índice de

equidade J de Shannon do estudo até o momento, apresentando o índice de 0,6279 para a EM2 e de 0,7105 para a EM3 (Figura 21C).



**FIGURA 21** GRÁFICOS APRESENTANDO OS DADOS ESTATÍSTICOS DO PERÍODO SECO DE: (A) DIVERSIDADE DE SHANNON-WIENER; (B) DOMINÂNCIA DE SIMPSON; (C) EQUIDADE; (D) RIQUEZA DE JACKKNIFE (1ª ORDEM)

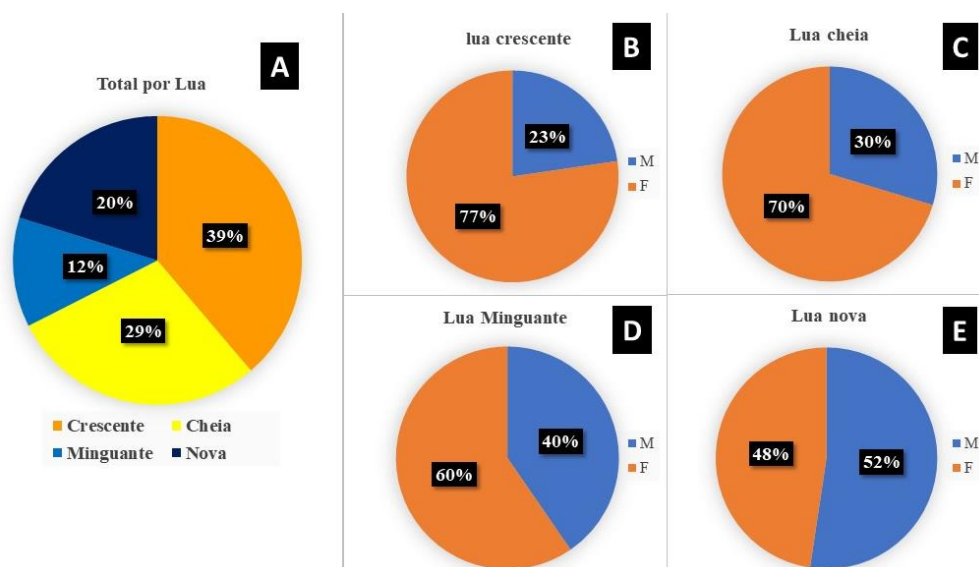
**TABELA 4** TEST *T-STUDENT* PARA DIVERSIDADE DO PERÍODO SECO, ASSUMINDO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA  $P=0,05$  (5% DE PROBABILIDADE). \* HÁ ALTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS DIVERSIDADES, SEGUNDO O TESTE T PARA  $H^0$  A 5% DE PROBABILIDADE

	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5
EM1		4,3758*	4,7995*	1,7762	2,3811*
EM2	4,3758*		0,8933	6,4721*	6,6493*
EM3	4,7995*	0,8933		6,5045*	6,7167*
EM4	1,7762	6,4721*	6,5045*		1,1627
EM5	2,3811*	6,6493*	6,7167*	1,1627	

A dominância esteve significativamente semelhante nas EM's 1, 4 e 5 no período seco (Figura 21B), novamente pela alta densidade da presença da espécie *Ps. hirsutus hirsutus*, a qual apresentou a quantitativo, 87%, 89% e 90% do total de flebotomíneos capturados nas respectivas EM's como pode ser observado no mapa B (Figura 19). A EM4 foi a estação que apresentou a maior riqueza estimada segundo o índice de Riqueza de Jackknife de 1ª ordem (Figura 21D).

### Avaliação da influência da fase lunar na coleta de flebotomíneos:

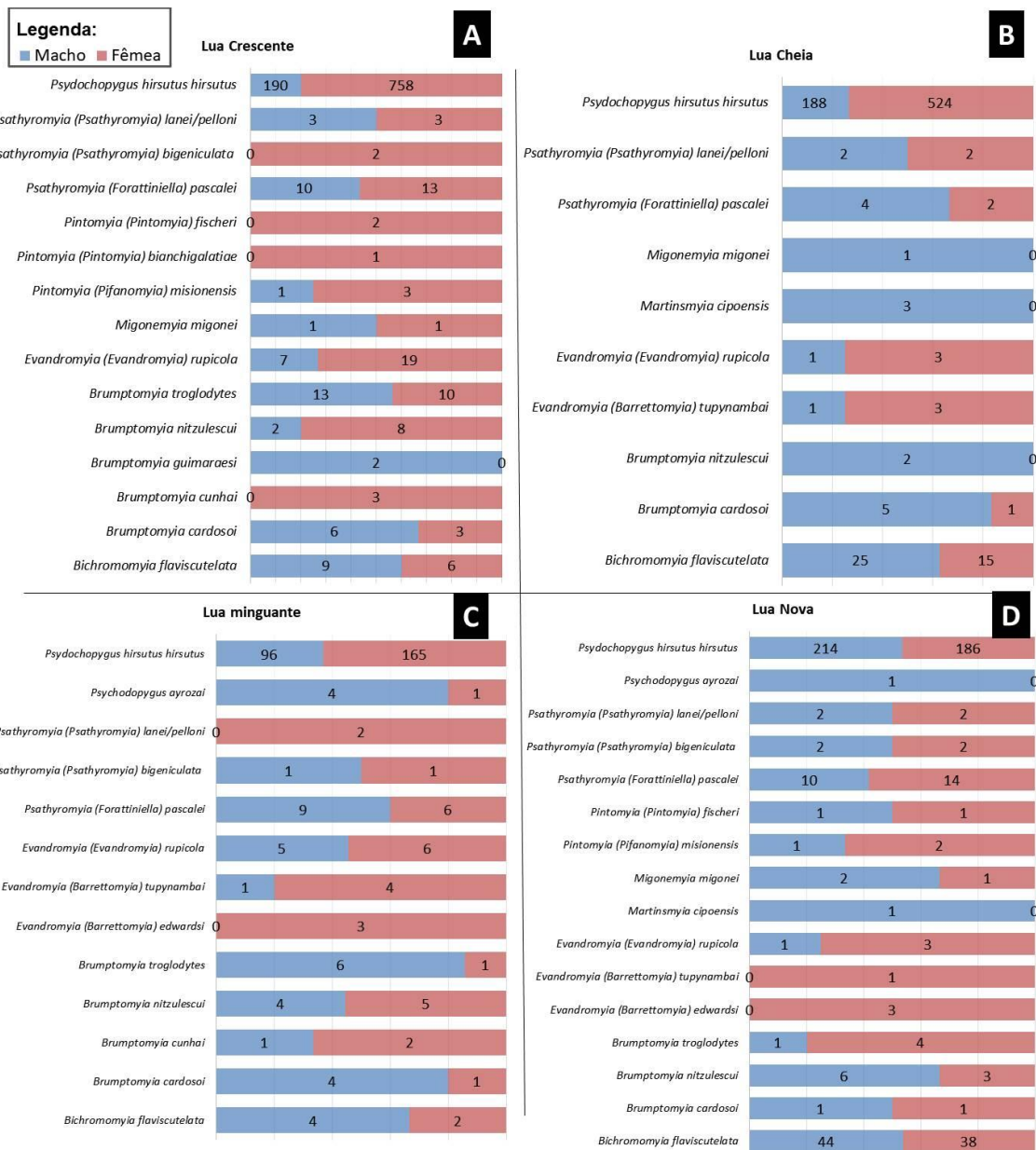
Ao observarmos o padrão de distribuição dos flebotomíneos capturados nos meses de 2019 correlacionando com a fase da lua do período de captura, foi possível notar um padrão de maior densidade de flebotomíneos no período de fases da lua de maior intensidade luminosa. Na lua crescente foi capturado 39% do total de flebotomíneos do estudo, seguida da lua cheia com 29% dos flebotomíneos capturados (Figura 22A).



**FIGURA 22** PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS NOS PERÍODOS DE FASE DA LUA, ONDE A: DISTRIBUIÇÃO EM % POR FASE DA LUA; B: DENSIDADE DE MACHOS E FÊMEAS NA LUA CRESCENTE; C: DENSIDADE DE MACHOS E FÊMEAS NA LUA CHEIA; D: DENSIDADE DE MACHOS E FÊMEAS NA LUA MINGUANTE; E: DENSIDADE DE MACHOS E FÊMEAS NA LUA NOVA.

A distribuição dos flebotomíneos durante as fases da lua possibilitou observar um padrão na distribuição de machos em relação às fêmeas. Durante as fases de lua com maior intensidade luminosa a densidade da captura de fêmeas foi maior que de machos. Na lua crescente e na lua cheia as fêmeas totalizaram 77% e 70%, respectivamente, dos flebotomíneos capturados em cada período (Figura 22B e C). Nos períodos de menor intensidade luminosa (luas minguante e nova) a proporção de machos observada foi maior. Em que, no período de noites escuras (lua nova) os machos compreenderam 52% do total de flebotomíneos capturados (Figura 22E), se configurando como o período de maior densidade de machos capturados no estudo.

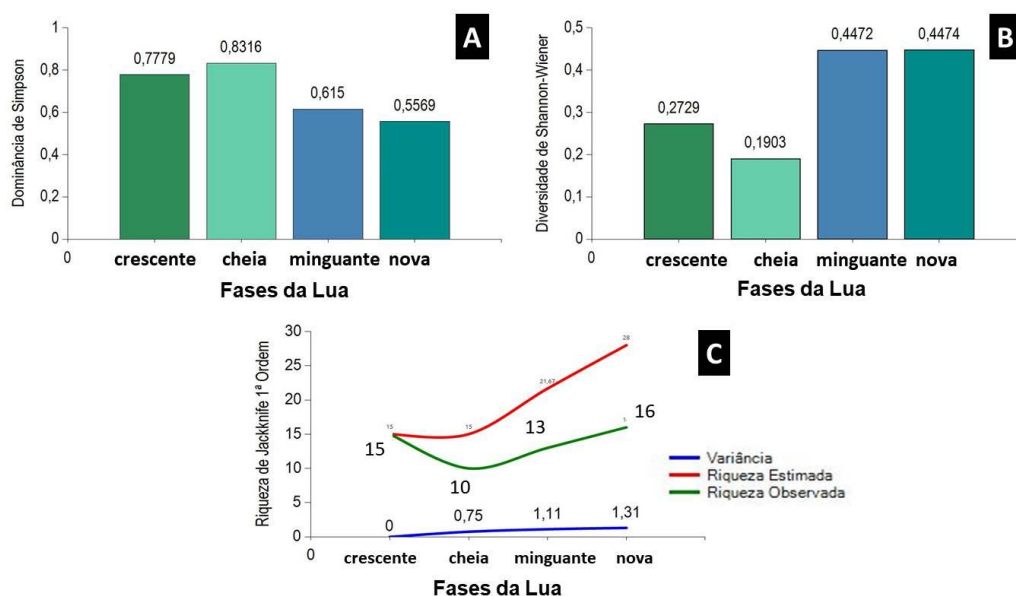
Esse padrão pôde ser observado nas espécies de importância médica, encontradas infectadas naturalmente por *Leishmania* spp. A espécie com maior densidade no estudo foi *Ps. hirsutus* que apresentou uma densidade de 214 machos e 186 fêmeas nos meses de lua nova, e a espécie *Bi. flaviscutellata* apresentou a densidade de 44 machos e 38 fêmeas capturadas, a lua nova foi aquela de maior densidade da espécie em todo o estudo, com 82 exemplares ao total neste período (Figura 23D).



**FIGURA 23** COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO NAS FASES DE LUA DAS ESPÉCIES SEPARADAS POR MACHO E FÊMEA, ONDE A COR AZUL REPRESENTA OS MACHOS E A COR VERMELHA REPRESENTA AS FÊMEAS. SENDO O GRÁFICO (A) A REPRESENTAÇÃO DA LUA CRESCENTE, SEGUIDO DO GRÁFICO (B) REPRESENTANDO A LUA CHEIA; O GRÁFICO (C) A REPRESENTAÇÃO DA LUA MINGUANTE; E NO GRÁFICO (D) A REPRESENTAÇÃO DA LUA NOVA.

A espécie *Ps. hirsutus* apresentou um padrão diferente de densidade nas fases de lua de maior intensidade luminosa, onde a maior densidade de fêmeas foi observada na lua crescente e cheia. Sendo capturado na lua crescente um quantitativo de 758 fêmeas da espécie, contrapondo com apenas 190 machos (Figura 23A). Assim como na lua cheia que apresentou um total de 524 fêmeas e apenas 188 machos ao todo (Figura 23 B).

Apesar da lua cheia compreender a segunda maior densidade de flebotomíneos do estudo, e a maior dominância de 0,8316 na dominância de Simpson (Figura 24A), esse período apresentou a menor diversidade de espécie de 0,1903 na diversidade de Shannon-Wiener (Figura 24B) se comparados aos demais períodos lunares, e conseqüentemente a menor riqueza dentre as demais fases da lua (Figura 24C). Estes dados são opostos ao observado na lua nova que compreendeu o maior número de espécies do período sendo a maior diversidade de espécie entre os períodos lunares, apresentando a maior riqueza de Jackknife (Figura 24C).



**FIGURA 24** GRÁFICOS APRESENTANDO OS DADOS ESTATÍSTICOS DAS FASES DA LUA ONDE O GRÁFICO (A) REPRESENTA A DOMINÂNCIA DE SIMPSON; (B) DIVERSIDADE DE SHANNON-WIENER; (C) RIQUEZA DE JACKKNIFE (1ª ORDEM)

Contudo, ao estabelecer a proporção de machos e fêmeas (M:F) dessas espécies já descritas com importância médica pode-se observar que *Ps. hirsutus hirsutus* apresentou a maior proporção de machos apenas na lua nova, ainda que em uma proporção não significativa de 1,15, onde a proporção de fêmeas em dominância foi mais significativa na lua crescente (M:F=0,25) seguido da lua cheia (M:F=0,36) (Tabela 5). *Bi. flaviscutellata* apresentou maior prevalência de machos em relação às fêmeas em todas as fases da lua, onde a maior proporção foi na lua minguante (M:F=2), seguido da lua



cheia (M:F=1,67), sendo a única espécie vetora com maior densidade proporcional de machos na lua cheia (Tabela 5). As demais espécies apresentaram a maior proporção de machos na lua cheia ou na lua minguante (Tabela 5).

**TABELA 5 PROPORÇÃO DE MACHO E FÊMEA (M : F) DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS NAS DIFERENTES FASES DA LUA. NULL = CORRELAÇÃO NULA.**

<b>Espécie / M:F</b>	<b>Crescente</b>	<b>Cheia</b>	<b>Minguante</b>	<b>Nova</b>
<i>Psydochopygus hirsutus hirsutus</i>	0,25	0,36	0,58	1,15
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	Null	Null	4	Null
<i>Psathyromyia (Psathyromyia) lanei/pelloni</i>	1	1	0	1
<i>Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata</i>	0	Null	1	1
<i>Psathyromyia (Forattiniella) pascalei</i>	0,77	2	1,5	0,71
<i>Pintomyia (Pintomyia) fischeri</i>	0	Null	Null	1
<i>Pintomyia (Pifanomyia) misionensis</i>	0,33	Null	Null	0,5
<i>Migonemyia migonei</i>	1	Null	Null	2
<i>Evandromyia (Evandromyia) rupicola</i>	0,37	0,33	0,83	0,33
<i>Evandromyia (Barrettomyia) tupynambai</i>	Null	0,33	0,25	0
<i>Brumptomyia troglodytes</i>	1,3	Null	6	0,25
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	0,25	Null	0,8	2
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0	Null	0,5	Null
<i>Brumptomyia cardosoi</i>	2	5	4	1
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i>	1,5	1,67	2	1,16
<b>Total</b>	0,29	0,42	0,68	1,10

**Avaliação do hábito alimentar e presença de DNA de *Leishmania* spp. Em flebotomíneos:**

Sendo assim, apresentaremos nesse capítulo os dados das fêmeas ingurgitadas de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020, bem como os resultados parciais obtidos nas duas campanhas de campo realizadas em janeiro e fevereiro de 2020 e duas campanhas realizadas em agosto e setembro 2021 a fim de contemplar as análises de fêmeas não ingurgitadas para a avaliação de presença de DNA de *Leishmania* spp.

Dentro deste período 105 espécimes de flebotomíneos fêmeas foram armazenadas ao ser observado sangue em seu abdômen. Destas, 6 apresentaram-se positivas para a análise do hábito alimentar, onde, após o sequenciamento, na primeira amostragem 5 apresentaram similaridade correspondente a sangue de Tatu-mirim (*Dasyus septemcinctus*) e uma apresentou similaridade para sangue de Galinha (*Gallus gallus*). Contudo, após repetirmos essas análises a fim de revisar seus resultados, todas as seis amostras que se apresentaram positivas tiveram similaridade para sangue de Tatu-mirim (*Dasyus septemcinctus*) (Tabela 6).

**TABELA 6 AVALIAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E PRESENÇA DE DNA DE *LEISHMANIA* SPP. DE FÊMEAS INGURGITADAS CAPTURADAS DE JANEIRO DE 2019 A FEVEREIRO DE 2020 NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS.**

	N	L <i>brasiliensis</i>	Hábito 1		Hábito 2		Hábito + DNA Leishmania	
			Tatu	Galinha	Tatu	Galinha	Tatu+L <i>brasiliensis</i>	Galinha+L <i>brasiliensis</i>
<i>Psathyromyia</i> ( <i>forattiniella</i> ) <i>pascalei</i>	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Psychodopygus</i> <i>hirsutus hirsutus</i>	84	5	3	1	4	0	1	0
<i>Bichromomyia</i> <i>flaviscutelata</i>	15	0	0	0	0	0	0	0
<i>Psathyromyia</i> <i>lanei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia</i> <i>tupynambai</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Evandromyia</i> <i>rupícola</i>	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>Psathyromyia</i> ( <i>Psathyromyia</i> ) <i>pelloni</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	105	4	4	1	5	0	1	0

Dentre as amostras positivas para *Dasyus septemcinctus* (Tatu-Mirim) após a repetição das análises, pode-se observar que todas as amostras apresentaram um Query

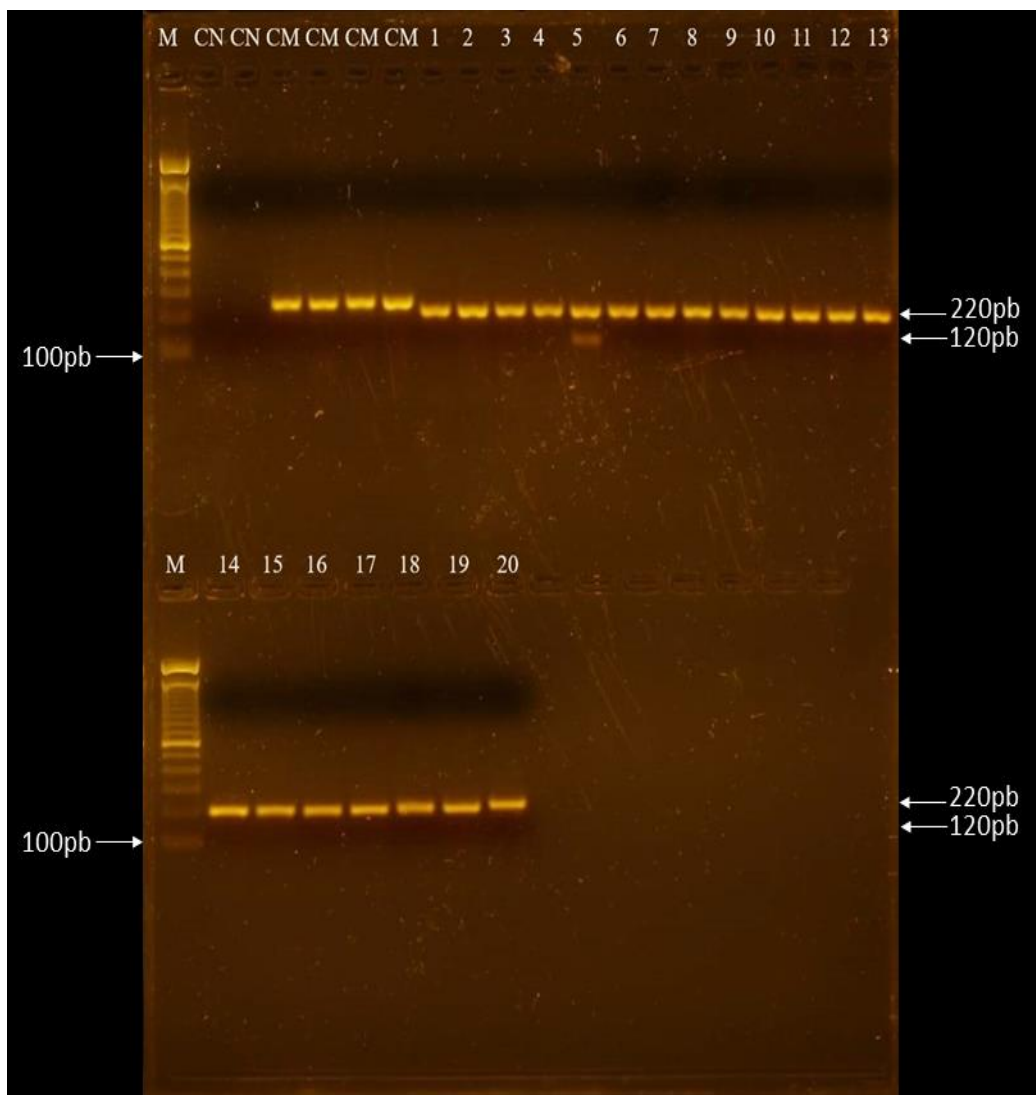
cover a partir de 80%, bem como um percentual de identidade maior que 90%, sendo o valor mais baixo atingindo 92,82% e o mais alto atingindo 99,69% de similaridade à sequência referente à amostra de *Dasyus septemcinctus* (Tabela 7).

**TABELA 7 AMOSTRAS DE FÊMEAS INGURGITADAS POSITIVAS PARA SANGUE NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2019 A FEVEREIRO DE 2020.**

Amostras	Scientific Name	Query Cover	E value	Per. Ident
5R	<i>Dasyus septemcinctus</i>	97%	9,00E-135	95.24%
66F	<i>Dasyus septemcinctus</i>	87%	6,00E-65	92.82%
66R	<i>Dasyus septemcinctus</i>	99%	3,00E-165	99.69%
68F	<i>Dasyus septemcinctus</i>	80%	6,00E-38	95.33%
68R	<i>Dasyus septemcinctus</i>	98%	2,00E-137	95.58%

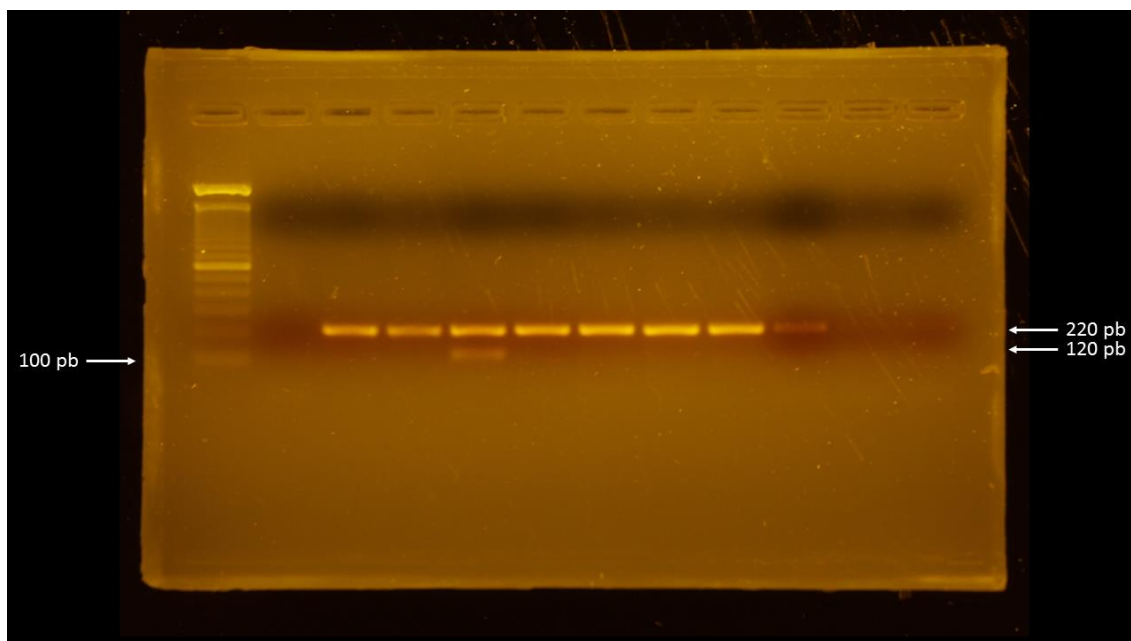
Nas demais amostras sequenciadas, algumas apresentaram o resultado de similaridade não significante encontrada (**Anexo 3**).

Nas amostras de fêmeas ingurgitadas foi observado ainda a amplificação da região de 120 pb, apontando a presença de DNA de *Leishmania braziliensis* (Figura 25), das quais, um espécime contendo sangue de *Dasyus septemcinctus*, foi positivo também para o DNA de *Leishmania braziliensis* (Tabela 6). As outras três fêmeas positivas para DNA de *Leishmania braziliensis* não apresentaram similaridade no sangue sequenciado. .



**FIGURA 25 GEL DE AGAROSE APONTANDO A AMPLIFICAÇÃO DO KDNA NA REGIÃO DE 120PB NO POÇO 5 DA AMOSTRA, REPRESENTANDO ASSIM A AMPLIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA* SPP. SENDO M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR, CN: CONTROLE NEGATIVO, CM: CONTROLE MACHO E PB: PARES DE BASE**

Quanto às análises das fêmeas não ingurgitadas, os espécimes de agosto e setembro 2021 foram armazenados para a execução das análises de avaliação de presença de DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas não ingurgitadas. Dessa forma, apenas 48 fêmeas foram analisadas. Destas, uma apresentou a amplificação do KDNA na região de 120pb em um espécime (Figura 26).



**FIGURA 26 GEL DE AGAROSE APONTANDO A AMPLIFICAÇÃO DO KDNA NA REGIÃO DE 120PB NO POÇO 5 DA AMOSTRA, REPRESENTANDO ASSIM A AMPLIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA* SPP. SENDO A PRIMEIRA COLUNA MARCADOR DE PESO MOLECULAR, A SEGUNDA APRESENTA O CONTROLE NEGATIVO, A TERCEIRA O CONTROLE MACHO E AS DEMAIS, CADA COLUNA REPRESENTA UMA FÊMEA. PB: PARES DE BASE**

Esses espécimes positivos tanto para a presença de KDNA de *Leishmania* spp. quanto para o hábito alimentar foram observados em sua maioria na estação de monitoramento 4 (EM4). Sendo 3 fêmeas ingurgitadas e 1 não ingurgitada de *Ps. hirsutus hirsutus* identificadas com a presença de KDNA de *Leishmania braziliensis* na EM4, e apenas 1 fêmea ingurgitada também de *Ps. hirsutus hirsutus* identificada com a presença de KDNA de *Leishmania braziliensis* na Estação de Monitoramento 1 (EM1) (Tabela 8).

**TABELA 8 IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE KDNA DE *LEISHMANIA* SPP. EM FÊMEAS INGURGITADAS E FÊMEAS NÃO INGURGITADAS POR ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO**

	Ingurgitadas					Não Ingurgitadas				
	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5
<i>Psathyromyia (forattiniella) pascalei</i>										
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>	1			3					1	
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i>										
<i>Psathyromyia lanei</i>										
<i>Evandromyia tupynambai</i>										
<i>Evandromyia rupicola</i>										

*Psathyromyia (Psathyromyia) pelsoni*

Enquanto, para a identificação do hábito alimentar todos os espécimes que tiveram amplificação positiva foram capturados na EM4, sendo 4 espécimes de *Ps. hirsutus hirsutus* positivos para o sangue de *Dasypus septemcinctus* (Tatu-mirim) e um espécime de *Evandromyia rupicola* para o mesmo mamífero *Dasypus septemcinctus* (Tabela 9).

**TABELA 9 IDENTIFICAÇÃO DA AVALIAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR POR ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO**

	Positivo para Tatu				
	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5
<i>Psathyromyia (Forattiniella) pascalei</i>					
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>				4	
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i>					
<i>Psathyromyia lanei</i>					
<i>Evandromyia tupynambai</i>					
<i>Evandromyia rupicola</i>				1	
<i>Psathyromyia (Psathyromyia) pelsoni</i>					

**Atividades de educação em saúde realizadas no Parque Estadual dos Três Picos, Cachoeiras de Macacu – RJ, Brasil.**

Durante o período de realização deste projeto, houve três atividades de aniversário do Parque Estadual dos Três Picos que ocorreram sempre no período próximo ao dia 05 de julho, Dia Nacional do Meio Ambiente e Aniversário do PETP. Dentro dessas atividades, como parte da proposta de execução deste projeto de doutoramento, realizamos a execução de atividades de educação em saúde junto às atividades de educação ambiental do PETP.

No ano de 2019, com as atividades ainda presencial, nossa equipe realizou a exposição de materiais didáticos-educativos abordando o tema das Leishmanioses no interior e ao redor do PETP e distribuindo panfletos educativos sobre as leishmanioses

(Figura 27). Bem como amplificamos nossa exposição à outros agravos que possuem os insetos como vetores de seus patógenos, tal como culicídeos, triatomíneos e também cimicídeos, todos com atividades executadas no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH), do Instituto Oswaldo Cruz-IOC.



A



B



C



D

**FIGURA 27 ATIVIDADE DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE REALIZADA NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS EM 2019 ONDE A: EQUIPE DO LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA EM DIPTERA E HEMIPTERA; B: MATERIAL EXPOSTO NO ANIVERSÁRIO DO PETP; C: JOGOS EDUCATIVOS SOBRE AS LEISHMANIOSES; D: FOLDERS INFORMATIVO-EDUCATIVO SOBRE AS LEISHMANIOSES, MATERIAL PRODUZIDO E FORNECIDO PELO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA DO LIVEDIH.**

Já no ano de 2020, devido as paralizações das atividades do PETP em respeito às normas estaduais para a pandemia do COVID-19, o evento presencial de aniversário do PETP foi cancelado. Contudo, juntamente com a equipe de educação ambiental, na posição de conselheira consultiva do PETP, desenvolvemos um evento online no ano de 2021 para a exposição de temas de educação ambiental (Figura 28A), dentre o qual, a exposição dos dados preliminares deste projeto foi apresentado ao público a fim de informar e alertar à população residente e visitante quanto aos riscos expostos no interior do PETP (Figura 27Figura 28B).



**2021**  
**semana do Meio Ambiente**

**PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS**  
 400 ANOS - 400 DE JANEIRO

**inea** AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE GOV RJ

**PROGRAMAÇÃO DE PALESTRAS**

A palestras serão divulgadas no canal do parque no YOUTUBE  
 link: [https://www.youtube.com/channel/UCB3EUA2mQgxuJuG\\_btZL3FA](https://www.youtube.com/channel/UCB3EUA2mQgxuJuG_btZL3FA)

- **O ECOTURISMO E A PANDEMIA DO COVID-19: RISCOS E DESAFIOS**  
 ○ Dr. Jonathan Gonçalves Oliveira - IOC/FIOCRUZ RJ **07/06**
- **ECOTURISMO NO PETP**  
 ○ Rominique Schmidt - coordenador dos guarda-parques **07/06**
- **INSETOS VETORES: CONVIVENDO SEM RISCO**  
 ○ Thamiris Balthazar - IOC/FIOCRUZ **08/06**
- **ANIMAIS PEÇONHENTOS: ACIDENTES EM PASSEIOS ECOTURÍSTICOS E RESIDENCIAIS**  
 ○ Guilherme Jones Souza - Vital Brasil **08/06**
- **PLANEJAMENTO URBANO-PAISAGÍSTICO - CONVERGÊNCIAS POSSÍVEIS AO DESENVOLVIMENTO E À CONSERVAÇÃO AMBIENTAL**  
 ○ Flávia Braga - UFF **09/06**
- **INCÊNDIOS FLORESTAIS: CAUSAS, PREVENÇÃO E AÇÃO**  
 ○ Bruno da Silva Braga - Guarda-Parque **09/06**
- **PROJETO GUAPIAÇU**  
 ○ Raquel Locke **10/06**
- **O SAGRADO AMBIENTE - AÇÕES SUSTENTÁVEIS NO RELIGIOSO**  
 ○ João Victor Gonçalves Ferreira - UERJ **10/06**
- **CAÇA ILEGAL - DO CRIME À LIBERDADE**  
 ○ Bethoven Garcia Paulo - Polícia Militar **11/06**
- **PASSARINHANDO NO PETP**  
 ○ Gabriel Mello - Professor em Queimados e mestrando UFRJ  
 Daniel Mello - Professor em Nova Iguaçu e mestrando UFRJ **11/06**

A

Powered by StreamYard

**PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS**  
 400 ANOS - 400 DE JANEIRO

**Insetos vetores: convivendo sem risco**

Mst Thamiris Balthazar

Thamiris Balthazar

IOC Instituto Oswaldo Cruz

B

**FIGURA 28 ATIVIDADE ONLINE DE ANIVERSÁRIO DO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS ONDE A: PROGRAMAÇÃO COMPLETA DA ATIVIDADE DIVULGADA PELO INEA; B: CAPA DE APRESENTAÇÃO DA PALESTRA SOBRE INSETOS VETORES NO PETP APRESENTADA PELA MST THAMIRIS BALTHAZAR**

Por fim, no ano de 2022 uma nova atividade presencial foi realizada, onde apresentamos novamente a exposição dos materiais didáticos, junto aos alunos de iniciação científica do LIVEDIH em parceria com a Universidade Iguazu (UNIG), alunos esses que foram orientados para participarem de futuras atividades tais como as executadas no evento. Dessa forma, o evento de 2022 foi pensando não só para realizar as atividades de educação em saúde, mas também para preparar novos alunos a darem continuidade às atividades em eventos futuros.



**FIGURA 29 ATIVIDADE DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE REALIZADA NO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS EM 2022 ONDE A: EQUIPE DO LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA EM DIPTERA E HEMIPTERA; B: EXPOSIÇÃO DO MATERIAL PARA CRIANÇAS PELA ALUNA DE IC ROSEMERE; C: EXPOSIÇÃO DO MATERIAL PARA ADULTOS PELA ALUNA DE IC SAMANTHA; D: MATERIAL DIDÁTICO EM BISCUIT E MASSINHA PARA EXPOSIÇÃO.**

## 5. Discussão:

Os dados revisados da distribuição das espécies de flebotomíneos no período de 2015 a 2022 no estado do Rio de Janeiro apontou que a maioria dos estados com casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) não possuíam estudos identificando os vetores destas regiões. E, apesar desta revisão ser realizada em complemento à revisão já publicada em 2014 por Carvalho et al. (19), no estudo anterior alguns municípios com casos de LTA também não possuíam a identificação dos vetores nas regiões (**Erro! Fonte d e referência não encontrada.**).

(19)

Dentre os municípios com casos de LTA notificados e sem nenhuma espécie de flebotomíneo identificado na região, o município de Cachoeiras de Macacu esteve representado nos dois estudos de revisão. Dessa forma, se faz importante a investigação epidemiológica da região, bem como estudos do levantamento entomológico para se compreender os ciclos da LTA que ocorrem no município.

### **Os flebotomíneos do Parque Estadual dos Três Picos:**

A alta densidade de flebotomíneos apresentada no Parque Estadual dos Três Picos, porém com um esforço amostral ainda não suficiente, pode ser justificada devido à grande dominância de *Ps. hirsutus hirsutus*. Uma vez que, ainda que capturados 2.826 espécimes de flebotomíneos distribuídos entre 22 espécies identificadas, 2.327 espécimes foram identificados todas apenas como essa espécie. As espécies de maior dominância no PETP *Ps. hirsutus hirsutus* e *Bi. flaviscutellata* já haviam sido identificadas como potencial vetoras, apresentando assim uma importância médica (50,68).

Em 1982, em um estudo realizado no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), localizado em um mesmo corredor ecológico do PETP há aproximadamente 40 Km de distância em linha reta, foi observado uma correlação na flutuação sazonal da espécie *Ps. hirsutus hirsutus* junto à espécie *Ps. ayrozai*, apontando que *Ps. hirsutus hirsutus* esteve concentrada nos meses frios e secos do ano (Período seco) (41). Contudo, os dados do índice de abundância do PETP pode-se observar que a espécie em questão demonstrou uma característica diferente, no qual *Ps. hirsutus hirsutus* apresentou o maior índice de abundância nos dois períodos do ano (seco e chuvoso), enquanto *Ps. ayrozai* apresentou baixa abundância nos dois períodos (seco e chuvoso),

Nossos dados apontam ainda que, diferente de PARNASO (38), a espécie *Ps. ayrozai* não foi capturada no período seco, sendo capturada com baixa representação nas estações de monitoramento com maior característica de degradação ambiental antrópica, com vegetação caracteristicamente de reflorestamento recente (troncos de pequeno diâmetro), e mais próximas às residências. Sendo esse um fator que pode ter influenciado na variação dos dados comparados com o PARNASO, uma vez que esses corredores ecológicos foram preservados e reflorestados ao longo desses anos, juntamente com a criação de novos parques de preservação como o PETP criado em 2002 (52)

Essa hipótese se fortalece com a observação de estudos mais recentes em fragmentos do mesmo corredor ecológico, nos municípios vizinhos a Cachoeiras de Macacu, de Silva Jardim e Casemiro de Abreu. Nestes estudos anteriores *Ps. hirsutus hirsutus* já se apresentava como a espécie mais dominante em todo o estudo nos anos de 1996 a 1998, com expressiva predominância no ambiente de floresta mais preservadas em Casemiro de Abreu (55) De forma que a espécie *Ps. ayrozai* esteve presente apenas em Silva Jardim onde o ambiente era mais antropizado (55) em comparação com a espécie *Ps. hirsutus hirsutus* que é correlacionada a ambientes mais preservados (69).

O processo de degradação ambiental contribui para a alteração na fauna flebotomínica diminuindo a riqueza de espécie da região, bem como diminuindo a densidade de espécimes (70) Em nosso estudo, comparando com os dados relatados no mesmo corredor ecológico em períodos diferentes, podemos associar que a recuperação e proteção de áreas ambientais podem contribuir para uma maior densidade e riqueza da fauna flebotomínica. E, dessa forma se torna favorável a prevenção de casos humanos,

uma vez que a oferta alimentar sanguínea se torna mais rica, evitando assim que esses flebotomíneos procurem o peridomicílio em busca de repasto.

Já a espécie *Mg. migonei*, mesmo presente nas capturas, apresentou uma baixa representatividade no presente estudo, visto que é característico dessa espécie uma menor densidade em floresta de crescimento secundário (18), como observado no PETP. Esta espécie esteve relacionada ainda ao período encontrado, tendo a presença relatada no período chuvoso, como os meses de verão, e ausente nos meses de baixa umidade e temperatura (18,33,71,72).

A espécie *Bi. flaviscutellata* foi a segunda espécie mais dominante do estudo. A densidade de *Bi. flaviscutellata* no período seco deve ser analisada com atenção devido ter sido utilizada exclusivamente armadilha de fonte luminosa, sendo essa espécie contudo capturada em maior densidade com armadilha *Disney* que utiliza uma fonte animal como roedores, segundo a literatura (68,73). Ou seja, acredita-se com base nessas evidências que a densidade da espécie pode ser ainda mais expressiva que nas capturas de armadilha luminosa, aumentando ainda a importância para a região de estudo, uma vez que a espécie é incriminada com vetor de *L. amazonensis* que causa a leishmaniose cutânea difusa (21,33,68).

### **Avaliação da diversidade de flebotomíneos:**

Quanto a avaliação da captura dessas espécies nas Estações de Monitoramento, podemos associar as características ambientais de cada estação com o encontro de algumas espécies. Na EM4, onde a riqueza se mostrou maior nos dois períodos, é importante salientar que é conhecida por “trilha dos bichos” por ser o local do PETP em que mais se avistam animais e tocas frequentes no solo ao longo de toda a trilha. Nossa equipe no mês de novembro pode observar a presença de dois bugios e um tatu nessa mesma EM, contudo o registro foi impossibilitado pela agilidade da fuga dos animais ao nos avistarem. Dessa forma, a maior riqueza na EM4 pode estar relacionada a maior disponibilidade de fonte alimentar concentrada, uma vez que as espécies de flebotomíneos possuem diferentes preferências alimentares, características de cada espécie, muitas apresentando ainda uma grande plasticidade alimentar (74)

Ainda na EM4, além da riqueza encontrado nos dois períodos do ano, essa EM foi marcada pela presença de cinco espécies do gênero *Brumptomyia*, o qual já foi relacionado com a presença de espécies desse gênero em toca de tatu que serve de abrigo e fonte alimentar sanguínea para as espécies do gênero (34). O registro da espécie *Pi. fisheri* na EM3 que contempla árvores de maior diâmetro, as quais formam espaços e ocos de árvore associados como abrigo da espécie, já foi relatado em estudo observado em outra área de proteção (34). Além disso, o registro de *Ev. rupicola* na EM3 está fortemente associada a ambientes rochosos, como seu nome evidencia, a qual possui esse solo característico com muitas formações rochosas e pequenas cavernas formadas pela sobreposição dessas rochas(34).

É importante salientar ainda que no período seco foi detectado importante quantitativo da espécie *Bi. flaviscutellata*, vetor de *L. amazonensis* (21,68), se configurando como a segunda espécie mais capturada neste período, com maior densidade nas EM2 e EM3. Sendo assim, a presença das espécies de flebotomíneos em cada EM pode estar diretamente relacionada à flora bem como a fauna presente em cada EM, de forma que em diferentes ambientes pode haver atrativos preferencias diferentes para cada espécie (74,75)

#### **Avaliação da influência da fase lunar na coleta de flebotomíneos:**

Nossos resultados demonstram uma forte correlação da densidade e riqueza de flebotomíneos com as fases da lua, bem como a correlação da densidade de machos e fêmeas capturados. Estudos com flebotomíneos utilizando a armadilha luminosa apontam a lua nova como o período de maior densidade de captura (42,45,46,54), justificando que a luminosidade da lua cheia gera uma influência competitiva com o atrativo luminoso da armadilha (40,45,76). Contudo nossos resultados não corroboram com estes relatos.

Na literatura os estudos que descrevem, assim como nossos resultados, a lua cheia como o período de maior densidade de flebotomíneos capturados tem em comum a presença de animal, seja esse como atrativo (77,78) ou com armadilhas luminosas próximo à locais de criação de animais (79). Outro estudo que corrobora com esses resultados utilizou armadilha luminosa próximo à residência de um paciente com

leishmaniose (80), onde esse fator de atração de flebotomíneos por indivíduo infectado é mais bem discutido para a espécie vetora *Lu. longipalpis* (81,82).

A correlação de densidade de machos e fêmeas também pode ser associada com a atração de feromônios sexuais (83). Justificando a maior proporção de machos na lua cheia nos locais com presença de animais por se direcionarem a esses locais, no período de crepúsculo, antes das fêmeas, para que ocorra o acasalamento na chegada dessas (77). Contudo, mesmo apresentando um maior valor proporcional de machos na lua cheia em algumas espécies como *Bi. flaviscutellata*, em números absolutos de machos e de fêmeas essa densidade se mostrou mais expressiva na lua nova, sendo nessa lua a maior densidade geral dessa espécie.

A densidade absoluta de machos e de fêmeas de algumas espécies, principalmente as de importância médica na lua nova, pode estar relacionada com a maior atividade de pequenos mamíferos nesse período, os quais aproveitam a menor intensidade luminosa para sair de seus abrigos em busca de alimentos com risco menor de serem predados (84–86). A saída dos pequenos mamíferos, como os pequenos roedores na lua nova estimula também a maior densidade das espécies de flebotomíneos, como *Bi. flaviscutellata*, a qual apresenta o hábito alimentar preferencial à pequenos roedores (46). Esse fator pode estar diretamente relacionado também a maior atração de uma fauna diversa no período de lua nova encontrado em nosso estudo.

Contudo, outras espécies de pequenos mamíferos optam pela lua cheia para a maior atividade noturna pois a claridade os beneficia na identificação de predadores possibilitando o forrageamento (87). Esses mamíferos podem justificar a maior densidade absoluta de flebotomíneos da espécie *Ps. hirsutus hirsutus*, juntamente com a intensidade luminosa provocando um prolongamento da luminosidade semelhante ao período crepuscular, como já discutido acima, de forma que a lua crescente e a lua cheia contemplaram os períodos de maior densidade dessa espécie, respectivamente.

Em nosso estudo, a confirmação do hábito alimentar de *Ps. hirsutus hirsutus* para a espécie de Tatu-Mirim *Dasypus septemcinctus*, a qual, segundo alguns estudos da literatura, as espécies do gênero *Dasypus* spp. apresentaram atividade em noites mais escuras (88,89), enquanto em outros estudos este gênero apresentou atividade semelhante em todas as fases da lua (90,91) Dessa forma, tendo em vista ainda o hábito alimentar eclético da espécie *Ps. hirsutus hirsutus* já citado (74), se faz necessários mais estudos

quanto ao hábito alimentar bem como quanto a atividade dos flebotomíneos juntamente com a atividade de mamíferos nos períodos lunares no PETP.

A escolha dos nossos pontos de captura priorizando locais com a presença de tocas de animais, pequenas cavernas que podem ser utilizadas de abrigos, e fragmentos próximos às residências com presença animal e ainda a escolha por locais mais abrigados da luz ambiente podem ser fatores que influenciaram positivamente no estudo de forma a não haver uma competitividade da luz atrativa da armadilha com a luminosidade da lua, possibilitando uma real reprodução da biologia natural desses insetos. Dessa forma, a lua é um fator que deve ser pensado também no planejamento de capturas de flebotomíneos (45), mas correlacionando ao local que será feito a instalação das armadilhas luminosas, onde a luminosidade excessiva não seja um fator adverso à eficiência desta (78). Podendo a lua ser considerada um determinante secundário na flutuação de populações, como relatado por Santos-de-Marco et al (42)

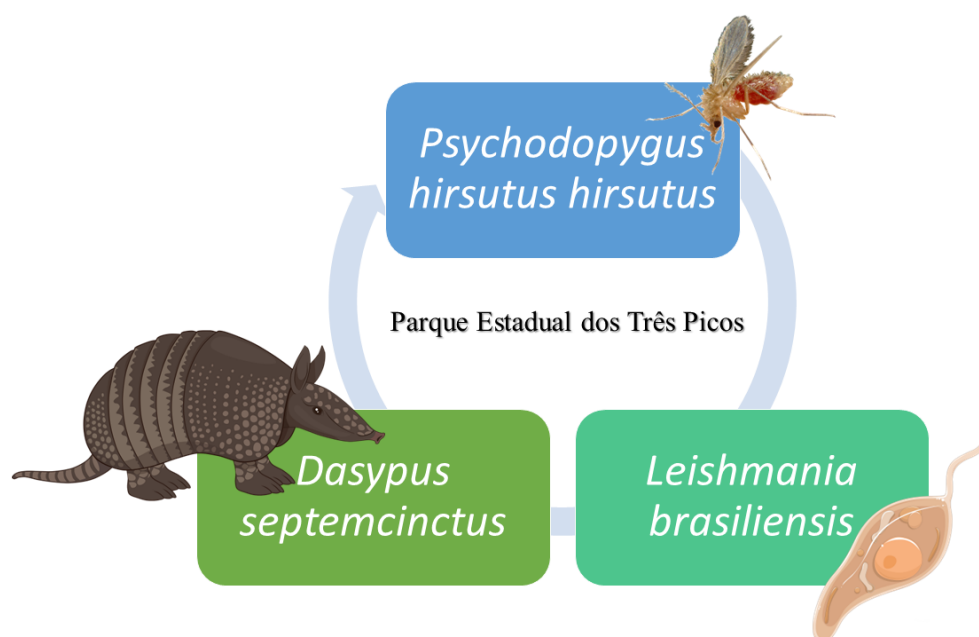
Esses fatores, porém, poderão ser discutidos de forma mais aprofundada após estudos realizados em paralelo com a avaliação da atividade de potenciais reservatórios nas áreas de estudo. Atividade esta que não conseguimos dar continuidade devido o período pandêmico, contudo será realizado posteriormente em diferentes localidades. Bem como poderemos associar ainda as análises de hábito alimentar que poderão nos direcionar quanto às preferências alimentar das espécies de flebotomíneos e as características da atividade noturna dos animais que servem de atrativo sanguíneo e possíveis reservatórios.

### **Avaliação do hábito alimentar e presença de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos:**

A identificação de sangue de *Dasyus septemcinctus* em fêmeas ingurgitadas apontam um importante indicador epidemiológico. Em estudo anterior já havia sido detectado DNA de *Leishmania* spp. em fígado de *Dasyus septemcinctus* (92), apontando assim que esta espécie de mamífero é um potencial reservatório para a região da sede do Jequitibá do Parque Estadual dos Três Picos



Além disso, a identificação de *Leishmania braziliensis* em fêmeas ingurgitadas reforça a hipótese de que a espécie *Dasypus septemcinctus* atua como reservatório de *Leishmania* spp. na região. O encontro de uma fêmea não ingurgitada positiva para a presença de *Leishmania braziliensis* em nosso estudo sugere que esteja ocorrendo um importante ciclo na região envolvendo o reservatório *Dasypus septemcinctus*, a espécie de protozoário *Leishmania braziliensis* e o potencial vetor *Ps. hirsutus hirsutus* (Figura 30).



**FIGURA 30 CICLO SILVESTRE DA *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* PROPOSTO PELOS RESULTADOS MOLECULARES DO PRESENTE ESTUDO**

Apenas o encontro de DNA de *Leishmania* spp. não se pode confirmar que a espécie *Ps. hirsutus hirsutus* seja vetora, se fazendo necessário mais estudos para incriminação desta espécie. Contudo, estudos anteriores já apontavam a hipótese desta espécie atuar como vetor da *Leishmania braziliensis* em outras regiões (50,93), reforçando assim a importância de ter encontrado a fêmea ingurgitada de *Ps. hirsutus hirsutus* com a amplificação do material genético de *Leishmania braziliensis* em nosso estudo.

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) notificam um caso de LTA por ano desde 2017 até 2020, em regiões próximas ao parque (51). E, apesar desses casos humanos notificados, até o presente momento não houve incriminação de potencial vetor na região. Dessa forma, tendo em vista a dominância de *Ps. hirsutus hirsutus*, bem como a presença de DNA de *Leishmania braziliensis* em nossos resultados e a congruência de casos humanos nas regiões próximas ao PETP, pode-se sugerir uma maior investigação direcionada à este vetor, uma vez que nossos resultados apontam uma forte relação com sua capacidade de ser o principal vetor de *Leishmania braziliensis* na região. Tornando-se necessário, ainda, uma maior vigilância também em outros locais do município de Cachoeiras de Macacu (26).

## 6. Conclusão:

O Parque Estadual dos Três Picos apresentou uma fauna rica que, contudo, aparenta ter uma riqueza ainda maior. A espécie mais dominante durante o período de um ano de coleta foi *Ps. hirsutus hirsutus*, a qual, ainda que dominante em todos os meses de coleta, apresentou uma correlação diretamente proporcional à temperatura média do período de coleta, onde nos meses de maiores temperaturas a espécie apresentou uma maior dominância. Enquanto a espécie *Bi. flaviscutellata*, a segunda espécie com maior densidade no estudo, apresentou correlação com a pluviometria, onde as maiores densidades da espécie ocorreram nos meses imediatamente seguinte aos meses de maiores índices de chuva.

Ao comparar as EM's estudadas, pode-se observar a EM2 com a maior diversidade e equidade significativamente no período chuvoso e a EM3 no período seco; A maior dominância do período chuvoso foi observada na EM1, contudo no período seco foi observada na EM5, mas sem diferença significativa com as EM1 e EM4; A maior riqueza nos dois períodos (seco e chuvoso) foi observada na EM4, associada a presença de diversos animais e tocas no local. Desta forma, o Parque Estadual dos Três Picos apresentou ecótopos favoráveis ao desenvolvimento de diferentes espécies de flebotomíneos, apresentando assim uma fauna rica e diversa.

Ao final deste estudo pode-se concluir que as fases da lua influenciam a densidade e riqueza de espécies, bem como a proporção de captura de machos e fêmeas. De forma que sugere-se que esta influência está diretamente relacionada com a influência da lua nas atividades dos mamíferos que são preferência alimentar destes flebotomíneos. Se fazendo necessário estudos mais aprofundados quanto a esta hipótese gerada em nossas análises.

E, por fim, nossos resultados possibilitaram ainda sugerir o possível ciclo de *Leishmania braziliensis* que ocorre no interior do PETP a fim de auxiliar os estudos de vigilância quanto aos casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana que ocorrem na região de Cachoeira de Macacu, próximo ao PETP. Sendo assim, sugerimos que há um ciclo silvestre ocorrendo entre as espécies de reservatório *Dasytus*

*septemcinctus*, a espécie de protozoário *Leishmania braziliensis* e o potencial vetor *Ps. hirsutus hirsutus*.

Concluimos assim que o PETP é uma importante região para a introdução do ser humano nos ciclos silvestres da LTA, de forma que se faz importante a manutenção de atividades de educação em saúde na região. Bem como é importante a constante vigilância entomológica e epidemiológica pelas secretarias de saúde e meio ambiente do município a fim de controlar e prevenir casos humanos na região.

## 7. Referências:

1. Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman JG, et al. Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/38/6/871/321006>
2. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Sachs SE, Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. Vol. 3, PLoS Medicine. Public Library of Science; 2006. p. 576–84.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. 2015.
4. Jorge Alvar, Sergio Yactayo, Caryn Bern. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol . 2006 Dec 22;22(12):552-7.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Vol. 7, PLoS ONE. 2012.
6. VILELA M, PPITA-PEREIRA D, AZEVEDO C, GODOY R, BRITTO C, RANGEL E. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:578-585.
7. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS/OMS. Informe epidemiológico das Américas. 2019 Mar.
8. Eunice Aparecida Bianchi Galati. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol. 1. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2021. p. 1–133.
9. Eunice Aparecida Bianchi Galati. Morfologia e Taxonomia . In: Rangel EF, Lainson R, editors. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro; 2003. p. 1–368.
10. SECCOMBE AK, READY PD, HUDDLESTON LM. A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). . Pap Syst Entomol. 1993;8:1–57.
11. YOUNG DG, DUNCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomology Institute. 1994;54:1–881.

12. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Vol. 27, Medical and Veterinary Entomology. 2013. p. 123–47.
13. PETERS W, KILLICK-KENDRICK R. Biology and epidemiology. Academic Press. Vol. 1. London; 1987. 1-120. p.
14. Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmanioses do continente americano. Leishmanioses do continente americano. Editora FIOCRUZ; 2014.
15. SANTOS SO, ARIAS J, RIBEIRO AA, HOFFMAN MP, FREITAS RA, MALACCO MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. 1998;12:315-317.
16. MISSAWA NA, VELOSO MAE, MACIEL GBML, MICHALSKY EM, DIAS ES. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. Rev Soc Brasil Med Trop . 2011;44(1):76–8.
17. de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Trop. 2010 Oct;116(1):108–10.
18. Inst Oswaldo Cruz M, Ferreira Rangel E, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Vol. 104. 2009.
19. Carvalho BM, Dias CMG, Rangel EF. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro state, Brazil: Species distribution and potential vectors of leishmaniasis. Rev Bras Entomol. 2014;58(1):77–87.
20. House M, Lainson R. ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE Ordinary Meeting The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Vol. 77, TRANSACTIONS OF THE ROYAL. SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. 1983.
21. Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Jul;101(7):735–7.
22. RANGEL EF, VILELA ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008;24:2948–52.
23. Brazil RP, Rodrigues AAF, Andrade-Filho JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. Entomol Ornithol Herpetol. 2014;04(02).

24. Elizabeth F. Rangel, Ralph Lainson. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz. Rangel EF, Lainson R, editors. Vol. 1. Rio de Janeiro; 2003. 1–368 p.
25. Galvis Ovallos F, Silva RA, Silva VG da, Sábio PB, Galati EAB. Leishmanioses no Brasil: Aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas (2020). In: Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários. Stricto Sensu Editora; 2020.
26. LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis in the New World. In: L Collier, A Balows, M Sussman, editors. Parasitology: Microbiology and Microbial Infections. Arnold. London; 2005.
27. Reginaldo Peçanha Brazil, Beatriz Gomes Brazil. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR, editors. Leishmanioses do continente americano. 2014.
28. Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Viannia, 1991 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:235-238.
29. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Figueiredo AB, 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. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99:905-913.
30. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Vol. 4, Medical and Veterinary Entomology. 1990.
31. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Vol. 58, Annual Review of Entomology. 2013. p. 227–50.
32. Reginaldo Peçanha Brazil, Beatriz Gomes Brazil. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: Rangel EF, Lainson R, editors. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro; 2003. p. 1–368.
33. Forattini OP. ENTOMOLOGIA MÉDICA. ED. Edgard Blucher. Forattini OP, editor. Vol. 4. São Paulo: ED da Universidade de São Paulo; 1924.
34. Aguiar G, de Medeiros WM, de Marco TS, dos Santos SC, Gambardella S. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, RJ . I- Fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Cad Saúde Públ. 1996;12(2):195–206.
35. Aguiar GM de, Vilela ML, Schuback P, Soucasaux T, Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro: III. Frequência horária (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Sep;80(3):339–48.

36. Aguiar GM, Schuback PD, Vilela ML, Azevedo ACR. Aspectos da Ecologia de Flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro. II. Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80(2):187–94.
37. Aguiar GM de, Vilela ML. Aspects of the ecology of sandflies at the Serra dos Orgãos National Park, state do Rio de Janeiro: VI. Shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987;82(4):585–6.
38. Bidlingmayer WL. The Effect of Moonlight on the Flight Activity of Mosquitoes. Vol. 45, Source: Ecology. 1964.
39. Barghini A, Urbinatti PR, Natal D. ATRAÇÃO DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) POR LÂMPADAS INCANDESCENTES E FLUORESCENTES. Entomol Vect [Internet]. 2004; Available from: [www.ugf.br/editora](http://www.ugf.br/editora)
40. Bowden J, Church BM. The influence of moonlight on catches of insects in light-traps in Africa. Part II. The effect of moon phase on light-trap catches. Bull ent Res. 1973;63:129–42.
41. de Aguiar GM, Soucasaux T. Ecological aspects of phlebotomus of the Parque Nacional da Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro. I. Monthly frequency in human baits (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(2):197–209.
42. de Marco TS, Marilia I, De C, Gaii M, Reginaldo E, Brazil' P. INFLUENCE OF THE LUNAR CYCLE ON THE ACTIVITY OF PHLEBOTOMINE SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE). J Am Mosq Control Assoc. 2002;18(2):20–2.
43. Kasili S, Ngumbi PM, Koka H, Ngere FG, Kioko E, Odemba N, et al. Comparative performance of light trap types, lunar influence and sandfly abundance in Baringo district, Kenya. Vol. 47, J VECTOR BORNE DIS. 2010.
44. Gebresilassie A, Yared S, Aklilu E, Kirstein OD, Moncaz A, Tekie H, et al. The influence of moonlight and lunar periodicity on the efficacy of CDC light trap in sampling *Phlebotomus (larrousius) orientalis* Parrot, 1936 and other *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae) in Ethiopia. Parasit Vectors. 2015;8(1).
45. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Silva VC, Peixoto AA, Rangel EF. Moonlight and blood-feeding behaviour of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae), vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Vol. 100, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005.
46. da Silva AA, Costa-Neta BM, Silva FS. Influence of moonlight on light-emitting diode trap catches of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae)1. Entomol News. 2020 Jan 7;129(1):35–42.



47. Ward R, Hamilton J, Dougherty M, Falcao A, Feliciangeli B, Perez Universidad Peruana Cayetano J, et al. Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera: Psychodidae). Vol. 83, Bulletin of Entomological Research. 1993.
48. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E AMBIENTAL, COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO LEISHMANIOSES Nº 001/2021 CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO: LEISHMANIOSES EM HUMANOS NO ESTADO DO RJ. 2021.
49. Inst Oswaldo Cruz M, Ferreira Rangel E, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Vol. 104. 2009.
50. Rangel EF, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of Além Paraíba, State of Minas Gerais, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta* hirsuta. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80:373–4.
51. Ministério da Saúde/SVS, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - RIO DE JANEIRO. Casos confirmados por Ano 1º Sintoma(s) segundo Município de residência. 2021.
52. INEA., Instituto Estadual do Ambiente., Parque Estadual dos Três Picos. PLANO DE MANEJO PARQUE ESTADUAL DOS TRÊS PICOS (PETP) RESUMO EXECUTIVO. 2013.
53. Scaramuzza CA de M, Simões LL, Rodrigues ST, Accacio GM, Hercowitz M, Rosa MR, et al. Visão da Biodiversidade da ecorregião da Serra do Mar. Supernova Design. Mayra Fernandes e Ribamar Fonseca, editor. WWF-Brasil; 2011. 1–167 p.
54. Aguiar GM, Vilela ML, Schuback PD, Soucasaux T, Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebotômos do PNSO. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80(4):465–82.
55. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Rangel EF. The Phlebotominae Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of Two Atlantic Rain Forest Reserves in the State of Rio de Janeiro, Brazil [Internet]. Vol. 96, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001. Available from: <http://www.wwf.org.br>
56. Galati EAB. Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. (II Intern. Symp. Phlebotomine Sandflies). Bol Dir Malariol Saneam Amb. 1995;35:133–42.

57. Hoover Pugedo, Ricardo A. Barata, João Carlos França-Silva, Jaime C. Silva, Edelberto S. Dias. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* . 2005;38(1):70–2.
58. MINUZZI RB, SEDIYAMA GC, BARBOSA EM, MELO JUNIOR JCF. Climatologia do comportamento do período chuvoso da região sudeste do Brasil. *Rev Bras Meteorol*. 2007;22:338–44.
59. Vilela ML, Rangel EF, Lainson R. Métodos de Coleta e Preservação de fehotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. p. 353–67.
60. MARCONDES CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomol News*. 2007;118:315–56.
61. Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Vol. 91, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 1996.
62. Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. *Insect Mol Biol* . 2002;11,:117-122.
63. Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degraive WM. An Oligonucleotide Probe Derived from kDNA Minirepeats is Specific for *Leishmania* (*Viannia*). Vol. 91, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 1996.
64. COLWELL RK. User's guide to EstimateS5 statistical. . 2004.
65. Roberts DR, Hsi BP. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environ Entomol*. 1979;8:1007–13.
66. RODRIGUES WC. DivEs - Diversidade de espécies [Internet]. 2005 [cited 2022 Jun 20]. Available from: [ebras.bio.br](http://ebras.bio.br)
67. Brower JE, Zar JH, von Ende CN. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. WCB Mc-Graw-Hill. 1997;4:1–273.
68. Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, de Santana ALF, da Costa SM, da Costa Rego TAN, et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: Potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors*. 2013;6(1).
69. Afonso MMS, Costa WA, Azevedo ACR, Costa SM da, Vilela ML, Rangel EF. Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007;3(3):725-730,.

70. Teodoro U, Kühl JB, dos Santos DR, dos Santos ÉS. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. 1999;15(4):901–6.
71. BARRETTO MP. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do estado de São Paulo (Ditera: Psy-chodidae). [São Paulo]: Faculdade de Medicina da USP; 1943.
72. TEODORO U, SALVIA\_FILHO VL, de LIMA EM, SPINOSA RP, BARBOSA OC, FERREIRA MEMC, et al. Flebotomíneos em áreas de transmissão de leishmaniose na região norte do estado do Paraná - Brasil: variação sazonal e atividade noturna. Rev Saúde Publica . 1993;27:190-194.
73. Disney RHL. A trap for phlebotomine sand flies attracted to rats. . Bull Entomol Res . 1966;56:445-451.
74. Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. J Trop Med. 2012;
75. Pereira Júnior AM, Souza ABN, Castro TS, da Silva MS, de Paulo PFM, Ferreira GEM, et al. Diversity, natural infection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera, psychodidae) in the western Brazilian amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019 Jun 1;114(6).
76. da Silva AA, Costa-Neta BM, Silva FS. Influence of moonlight on light-emitting diode trap catches of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae)1. Entomol News. 2020 Jan 7;129(1):35–42.
77. Brito GS, Aguiar JVC, de Sousa De Almeida M, Ponte IS, Neta BMC, Silva FS. Influence of moonlight on male mating aggregations of *Nyssomyia whitmani*, a vector of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. J Med Entomol. 2020 Sep 1;57(5):1648–52.
78. Gaglio G, Brianti E, Napoli E, Falsone L, Dantas-Torres F, Tarallo VD, et al. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. Acta Trop. 2014;133(1):73–7.
79. Morrison AC, Ferro C, Pardo R, Torres M, Wilson ML, Tesh RB. Nocturnal Activity Patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia [Internet]. Vol. 32, J. Metl. Entomol. 1995. Available from: <http://jme.oxfordjournals.org/>
80. Sherlock ÍA, Maia H, Gomes Dias-Lima A. RESULTADOS PRELIMINARES DE UM PROJETO SOBRE A ECOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENAR NO ESTADO DA BAHIA. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29(2):207–14.

81. Nevatte TM, Ward RD, Sedda L, Hamilton JGC. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
82. DOUGHERTY MJ, GUERIN PM, WARD RD, HAMILTON JGC. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. . *Physiol Entomol*. 1999;24:251–62.
83. Hamilton JGC, Brazil RP, Campbell-Lendrum D, Davies CR, Kelly DW, Pessoa FAC, et al. Distribution of putative male sex pheromones among *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96(1):83–92.
84. LOCKARD R, OWINGS D. Moon-related surface activity of bannertail (*dipodomys spectabilis*) and fresno (*d. nitratoides*) kangaroo rats. *Anim Behav*. 1974;22:262–73.
85. Johnson MD, de León YL. Effect of an invasive plant and moonlight on rodent foraging behavior in a coastal dune ecosystem. *PLoS One*. 2015 Feb 13;10(2).
86. KOTLER BP, J. BROWN, S. MUKHERJEE, O. BERGER-TAL, A. BOUSKILA. Moonlight avoidance in gerbils reveals a sophisticated interplay among time allocation, vigilance and state-dependent foraging. *Proceedings of the Royal Society of London B: Bio-logical Sciences* . 2010;277:1469–74.
87. Prugh LR, Golden CD. Does moonlight increase predation risk? Meta-analysis reveals divergent responses of nocturnal mammals to lunar cycles. *Journal of Animal Ecology*. 2014 Mar;83(2):504–14.
88. Harmsen BJ, Foster RJ, Silver SC, Ostro LET, Doncaster CP. Jaguar and puma activity patterns in relation to their main prey. *Mammalian Biology*. 2011 May;76(3):320–4.
89. Pratas-Santiago LP, Gonçalves ALS, Nogueira AJA, Spironello WR. Dodging the moon: The moon effect on activity allocation of prey in the presence of predators. *Ethology*. 2017 Jun 1;123(6–7):467–74.
90. de Matos Dias D, de Campos CB, Guimarães Rodrigues FH. Behavioural ecology in a predator-prey system. *Mammalian Biology*. 2018 Sep 1;92:30–6.
91. Huck M, Juárez CP, Fernández-Duque E. Relationship between moonlight and nightly activity patterns of the ocelot (*Leopardus pardalis*) and some of its prey species in Formosa, Northern Argentina. *Mammalian Biology*. 2017 Jan 1;82:57–64.
92. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2014 Jun 16;20(1).

93. Souza AAA de, Silveira FT, Lainson R, Barata I da R, Silva M das GS, Lima JAN, et al. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. Rev Panamazonica Saude. 2010 Mar;1(1).

## 9. Anexos:

### Anexo 1 Artigo publicado em 11/02/2022



## First record of *Migonemyia vaniae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Thamiris D'Almeida Balthazar<sup>1,2\*</sup>, Antônio Luís Ferreira de Santana<sup>1</sup>, Luiz Henrique Costa<sup>1</sup>, Jacenir R. Santos Mallet<sup>1,2,3</sup>, Mauricio Luiz Vilela<sup>1,2</sup>

**1** Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil • TAB: [thamirisbalthazar@gmail.com](mailto:thamirisbalthazar@gmail.com) • <https://orcid.org/0000-0003-4357-0399> • AFS: [antonio@ioc.fiocruz.br](mailto:antonio@ioc.fiocruz.br) • <https://orcid.org/0000-0001-5981-8673> • LHC: [lhcosta@ioc.fiocruz.br](mailto:lhcosta@ioc.fiocruz.br) • <https://orcid.org/0000-0001-6645-7028> • JSM: [jacemallet@gmail.com](mailto:jacemallet@gmail.com) • <https://orcid.org/0000-0003-4728-7638> • MLV: [mvillela.fiocruz@gmail.com](mailto:mvillela.fiocruz@gmail.com) • <https://orcid.org/0000-0001-7610-0719>

**2** Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**3** Universidade Iguaçu, Nova Iguaçu, RJ, Brazil

\* Corresponding author

### Abstract

In an investigation carried out at the headquarters of Jequitibá in Três Picos State Park, the presence of the sandfly *Migonemyia vaniae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007 was observed. Morphometric analyzes of the sperm pump and aedeagal ducts and photographs of the structures were performed to compare the differences between *Migonemyia vaniae* and *Migonemyia migonei* (França, 1920). Since its description, *Mg. vaniae* has been recorded only in the state of São Paulo. Therefore, we report the first encounter of this species in the state of Rio de Janeiro.

### Keywords

Atlantic Forest, distribution records, sandfly

Academic editor: Alexandre Pereira-Colavite | Received 26 July 2021 | Accepted 16 November 2021 | Published 11 February 2022

Citation: Balthazar TD, Santana ALF, Costa LH, Mallet JRS, Vilela ML (2022) First record of *Migonemyia vaniae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Check List 18 (1): 151–155. <https://doi.org/10.15560/18.1.151>

### Introduction

Sandflies are blood-feeding dipterous insects of the subfamily Phlebotominae in the family Psychodidae and present preferentially nocturnal twilight habits. These mosquitoes are the vectors of the leishmaniasis disease, which is caused by many trypanosomatid species of the genus *Leishmania* (Ross, 1903) (Rangel and Lainson 2003).

Currently, 1047 taxa of subfamily are described worldwide, including 1016 extant and 31 fossil species. In

the American continent, there are 546 species known—529 extant species and 17 fossil species (Galati 2019)—and about 10% of the extant species may be involved in the transmission of human pathogens (Seccombe et al. 1993; Young and Duncan 1994; Maroli et al. 2013). The lack of ecoepidemiological studies in uninvestigated regions suggest that only a small portion of the estimated total arthropods in the world are described (Hamilton et

©The authors. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

al. 2011; Basset et al. 2012; Lamarre et al. 2016).

The Três Picos State Park (Três Picos State Park) is located in serra do Mar, in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro, covering an area of 65,113 ha of the state, where the highest biodiversity index in the state is located. It is the largest nature conservation unit in the state and is within the limits of five municipalities: Cachoeiras de Macacu (about two-thirds of the park's area are in this municipality), Nova Friburgo, Teresópolis, Guapimirim, and Silva Jardim. The park protects a fragment of Atlantic Forest composed of dense ombrophylous forest and tropical climate (INEA 2009). The headquarters of Jequitibá is in the municipality of Cachoeiras de Macacu, about 400–500 m above sea level. Surveys of the sandfly fauna have previously been carried out in PETP.

Here, we report the first record of *Migonemyia vaniaae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007 in the state of Rio de Janeiro. This species was described from material collected in the Ribeira Valley, near the Alto da Serra de Paranapiacaba biological reserve in the state of São Paulo (Galati et al. 2007). Our new record expands the known geographic distribution of this species, which until now was thought to be restricted to the state of São Paulo.

## Methods

Field campaigns were carried out under collection authorization (no. 058/2015) of the Instituto Estadual do Ambiente (INEA). Monthly captures were made in PETP, at the Jequitibá headquarters located in Cachoeiras de Macacu (22°24'57"S, 042°36'30"W), with the use of CDC light traps model HP (Pugedo et al. 2005) for approximately 24 h from November 2016 to October 2017.

The traps were arranged in five monitoring stations (MS) established according to the tracks present inside the headquarters, these being: MS1: entrance of headquarters, near bamboo plantation (22°24'50"S, 042°36'49"W); MS2: Crystal Trail, near the waterfall (22°24'58"S, 042°36'33"W); MS3: Giant Jequitibá Trail, near Jequitibá (22°25'04"S, 042°36'37"W); MS4: Observatory Trail, climbing near the lake located at the park's head (22°24'53"S, 042°36'32"W); MS5: trail behind the visitation room near the waterfall (22°25'01"S, 042°36'23"W).

The collected material was euthanized by freezing and then preserved in alcohol 70%. In the laboratory, the sandflies were submitted to a process of clarification and diaphanization in Elisa plates. The process was initiated with the immersion of the sandflies in 10% potassium (KOH) for 2–3 hours; they then were immersed in acetic acid for 20 min to remove excess fat and washed in type II water for the amount of time, and finally put in lactophenol for 24 h to clarify the structures used in the diagnosis of the species (Vilela et al. 2018).

Male and female sandflies were mounted on a slide in Berlese liquid with a coverslip using a stereoscopic microscope. Specimens were identified under an optical

microscope with the aid of the dichotomous key proposed by Galati (2003, 2019). Abbreviations of species names are as suggested by Marcondes (2007).

Our slide preparations of *Mg. vaniaae* and *Migonemyia migonei* (França, 1920) were photographed under an optical microscope (PrimoStar, Carl Zeiss) with an AxioCam camera (Carl Zeiss). The Carl Zeiss Imaging Systems v. 4.7.2 was used to perform measurements of the ejaculatory sperm pump and aedeagal.

## Results

After 12 months of capturing sandflies, two male specimens identified as *Migonemyia vaniaae* were collected. One specimen was collected in March 2017 and another in October 2017, both at MS4: Observatory Trail, climbing near the lake located at the park's head.

**New records.** BRAZIL – Rio de Janeiro • Cachoeiras de Macacu, Três Picos State Park, headquarters at Jequitibá; 22°24'53"S, 042°36'32"W; 464 m alt.; 15.III.2017; T.D. Balthazar leg.; light trap CDC; 1 ♂, Colfleb NE 3289/21 slide no. 91897 • same locality; 19.X.2017; T.D. Balthazar leg.; light trap CDC; 1 ♂, Colfleb NE 3990/21 slide no. 91897.

**Identification.** We identified specimens of *Migonemyia migonei* and *Migonemyia vaniaae*. These two species present a short first flagelomer (F1), smaller than ½ of the head length (Fig. 1A, B), and genitalia with the internal spine implanted very close to the apex (Fig. 1C, D), as described by Galati (2003, 2019) and characteristic of species belonging to the genus *Migonemyia*.

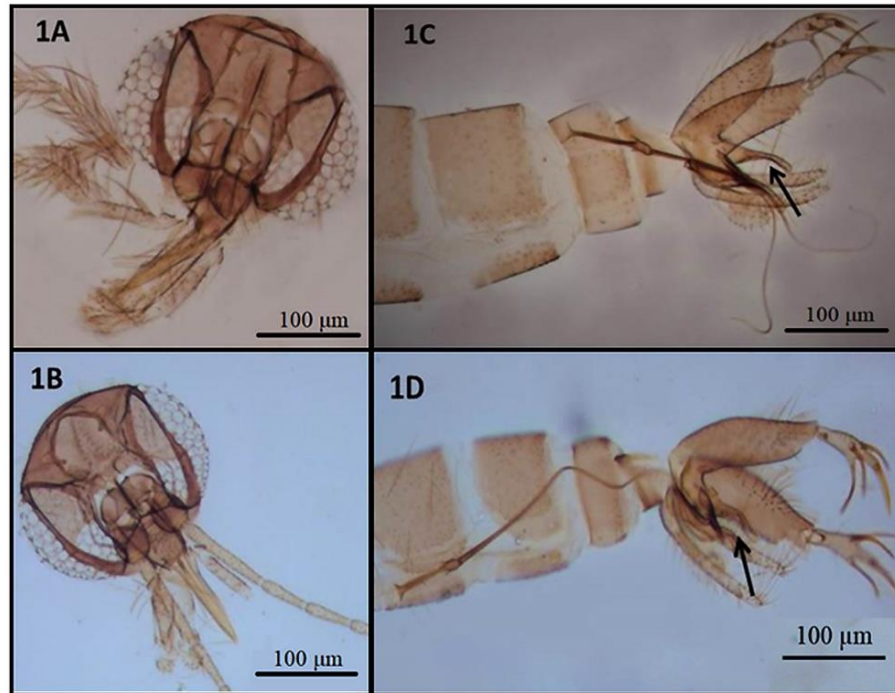
Analyzing the two specimens of *Mg. vaniaae*, we observed that the parameter is digitiform and its dorsal margin is slightly convex (Fig. 1C), while the specimens of *Mg. migonei*, the dorsal margin of the parameter is strongly convex (Fig. 1D), as shown by Galati et al. (2007).

The species were confirmed by studying the morphology of their aedeagal ducts, which is a taxonomic character pointed out by Galati et al. (2007). We observed that the two specimens of *Mg. vaniaae* had an average spermatic pump length of 145.803 µm and an average aedeagal duct length of 646.37 µm; in four specimens of *Mg. migonei* was these were 122.40 µm and 545.06 µm, respectively (Table 1).

## Discussion

Galati et al. (2007) described *Migonemyia vaniaae* from the Ribeira Valley, a rural region of the state of São Paulo, near an Atlantic Forest reserve (24°33'01"S, 048°40'15"W). Although this previously known occurrence (the type locality) in the municipality of Santo André and our new record MS4 are 665 km apart, the two areas have important similarities in their biotopes (Fig. 2).

Both collection sites are fragments of Atlantic Forest and have a dense ombrophilous forest vegetation with high-altitude tropical climate (INEA 2009; Secretaria de



**Figure 1.** *Migonemyia vaniae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007 and *Migonemyia migonei* (França, 1920). **A.** *Mg. vaniae* head. **B.** *Mg. migonei* head. **C.** *Mg. vaniae* genitalia presenting the parameter (arrow), which is slightly convex in the dorsal margin. **D.** *Mg. migonei* genitalia presenting the parameter (arrow), which is strongly convex in the dorsal margin.

**Table 1.** Measurements of the spermatid pump (S.P.) and aedeagal ducts (E.D.) of the species *Migonemyia vaniae* and *Migonemyia migonei*.

Specimen		<i>Mg. vaniae</i>	<i>Mg. migonei</i>
1	S.P.	140.969 µm	122.344 µm
	E.D.	629.562 µm	527.964 µm
2	S.P.	150.638 µm	135.977 µm
	E.D.	663.185 µm	543.928 µm
3	S.P.	—	123.507 µm
	E.D.	—	542.305 µm
4	S.P.	—	107.761 µm
	E.D.	—	565.828 µm
Average	S.P.	145.8035 µm	122.3973 µm
	E.D.	646.3735 µm	545.0063 µm

Infraestrutura e Meio Ambiente 2020) and these account for the presence of *Mg. vaniae* in both sites. However, the altitude of the encounter of the type species and our report showed variation, where our new record was 464 meters above sea level, while the Ribeira Valley is 260 m above sea level, suggesting the encounter of this species within this range of altitude.

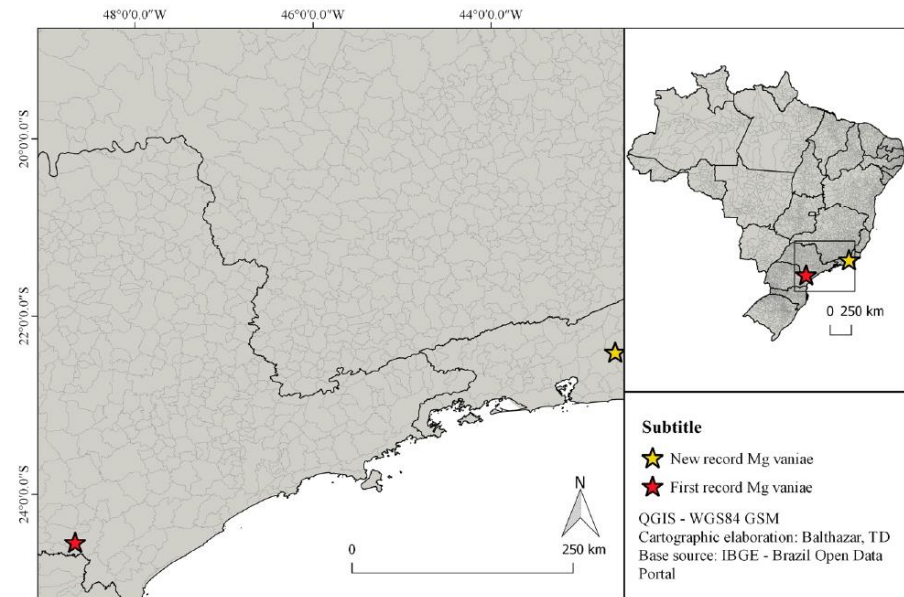
The genus *Migonemyia* has three species, of which *Migonemyia rabelloi* (Galati & Gomes, 1992) and *Mg. vaniae* were described from and only known from the

state of São Paulo (Galati et al. 2007). *Migonemyia migonei* has the greatest distribution and consequently its biology and medical importance is the best known.

*Migonemyia migonei* is naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* [syn. *Leishmania (Leishmania) chagasi*; Dantas-Torres 2006] in areas of Visceral Leishmaniasis transmission, through studies using molecular techniques (De Carvalho et al. 2010; Moya et al. 2015). However, although found infected, *Mg. migonei* has not yet been characterized as a vector for Visceral Leishmaniasis (Galvis-Ovallos 2019). However, *Mg. migonei* is a secondary vector of Tegumentary Leishmaniasis according to the literature (Rangel et al. 1986; Pita-Pereira et al. 2005)

Our morphological comparisons of *Mg. migonei* and *Mg. vaniae* corroborate the descriptions by Galati et al. (2007), who found that *Mg. migonei* presents a parameter with a strongly convex dorsal margin between two concavities, and ejaculatory ducts and a sperm pump measuring  $\leq 590$  µm and 130 µm, respectively. *Migonemyia vaniae* has a digitiform parameter with a slightly convex dorsal margin, and ejaculatory ducts and the spermatid pump measure  $\geq 640$  µm and 146 µm, respectively (Galati et al. 2007; Galati 2019). Thus, our data presented





**Figure 2.** Distribution map of *Migonemyia vaniae* Galati, Fonseca & Marassá, 2007. **A.** Detail showing the type locality (red star, 24°33'01\"/>

confirm the first record of the species *Mg. vaniae* from the state of Rio de Janeiro.

*Migonemyia vaniae* differs from *Mg. rabelloi* and *Mg. migonei* by their longer ejaculatory pump and edeagal ducts in relation to the other species.

Until now, 64 species had been reported to occur in the state of Rio de Janeiro (Galati 2019). With our new record of *Mg. vaniae*, 65 species (of the 1016 species currently described) are now known from the state (Galati 2019).

### Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We thank Dr. Eunice Galati for confirming the identification. And we also thank the reviewers and editors Alexandre Pereira-Colavite and Robert Forsyth for the important considerations for the improvement of this paper

### Authors' Contributions

Conceptualization: JSM, MLV. Data curation: ALFS, LHC. Formal analysis: TDB, ALFS. Investigation: TDB, LHC. Methodology: TDB, ALFS, MLV. Resources: TDB. Supervision: JSM, MLV. Validation: MLV. Visualization: TDB Writing – original draft: TDB. Writing – review and editing: JSM, MLV.


### References

- Basset Y, Cizek L, Cuénoud P, Didham RK, Guilhaumon F, Missa O, Novotny V, Odegaard F, Roslin T, Schmidl J, Tishechkin AK, Winchester NN, Roubik DW, Aberlenc HP, Bail J, Barrios H, Bridle JR, Castaño-Meneses G, Corbara B, Curletti G, Rocha WD, Bakker D, Delabie JHC, Dejean A, Fagan LL, Floren A, Kitching RL, Medianero E, Miller SE, Oliveira EG, Orivel J, Pollet M, Rapp M, Ribeiro SP, Roisin Y, Schmidt JB, Sorensen L, Leponce M (2012) Arthropod diversity in a rainforest. *Science* 338: 1481–1484. <https://doi.org/10.1126/science.1226727>
- De Carvalho MR, Valença HF, Da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Aratijo Pereira T, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP (2010) Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica* 116 (1): 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>
- Galati EAB, Fonseca MB, Marassá AM (2007) The subgenus *Migonemyia* (Galati, 1995) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), with description of a new species *Migonemyia vaniae*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 102 (5): 605–615. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000064>
- Galati EAB (2003) Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R (Eds) *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 23–51.
- Galati EAB (2019) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adulto. Public Heath School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 132 pp. <http://www.fsp.usp.br/egalati/index.php/2018/07/24/materiais/>. Accessed on: 2021-01-25.
- Galvis-Ovallos F, Da Silva MD, da Silva Bispo GB, De Oliveira AG, Neto JRG, dos Santos Malafrente R, Galati EAB (2017) Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pm-*

- omyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite 24: 2 <https://doi.org/10.1051/parasite/2017002>
- Hamilton AJ, Basset Y, Benke KK, Grimbacher PS, Miller SE, Novotny V, Samuelson GA, Stork NE, Weiblen GD, Yen JDL (2011) Quantifying uncertainty estimation of tropical arthropod species richness. The American Naturalist 176: 90–95. <https://doi.org/10.1086/652998>
- INEA (Instituto Estadual do Ambiente) (2009) Plano de manejo: Parque Estadual dos Três Picos. Versão integral. Governo do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 627 pp.
- Lamarre GP, Hérault B, Fine PV, Vedel V, Lupoli R, Mesones I, Baraloto C (2016) Taxonomic and functional composition of arthropod assemblages across contrasting Amazonian forests. Journal of Animal Ecology 85 (1): 227–239. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12445>
- Marcondes CBA (2007) Proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomological News 118: 351–356. [https://doi.org/10.3157/0013-872x\(2007\)118\[351:apogas\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3157/0013-872x(2007)118[351:apogas]2.0.co;2)
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L (2013) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology 27(2): 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Moya, SL, Giuliani, MG, Acosta, MM, Salomón, OD, Liotta, DJ (2015) First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. Acta Tropica 152: 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.015>
- Pita-Pereira, D, Alves, CR, Souza, MB, Brazil, RP, Bertho, AL, Figueiredo, AB, Britto, CC (2005) 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 99: 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>
- Pugedo HR, Barata A, França-Silva AJ, Silva JC, Dias ES (2005) HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38: 70–72. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000100017>
- Rangel EF, Lainson R (2003) Flebotomíneos do Brasil. Editora da Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 368 pp.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA (1986) Flebotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 81: 347–349. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761986000300013>
- Secombe AK, Ready PD, Huddleston LM (1993) A catalogue of Old World Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Occasional Papers on Systematic Entomology 8: 1–57.
- Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente (2020) Paranaipacaba – informações gerais. <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/paranapiacaba/informacoes-gerais/>. Accessed on: 2020-03-13.
- Vilela ML, Zwetsch A, Silva JS (2018) Methods for Capturing, Processing and Preserving Phlebotominae. In: Rangel EF, Shaw JJ (Eds.) Brazilian sand flies. Springer International Publishing, Rio de Janeiro, Brazil, 443–466. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_10)
- Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomology Institute 54. Associated Publishers, Gainesville, USA, 881 pp. <https://doi.org/10.21236/ada285737>

## ANEXO 2 ARTIGO SUBMETIDO EM 11/05/2022

ScholarOne Manuscripts™ Thamiris Balthazar ▾ Instructions & Forms Help

 **Journal of Medical Entomology**

[# Home](#) [Author](#) [Review](#)

Author Dashboard

**Author Dashboard**

- 1 Submitted Manuscripts >
- 1 Manuscripts with Decisions >
- 3 Manuscripts I Have Co-Authored >
- [Start New Submission](#) >
- 5 Most Recent E-mails >

### Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SU
SE: Navarro, Juan Carlos EIC: Taylor, David ADM: JME Editorial Office, JME Editorial Office	JME- 2022- 0148	First entomological survey of sandflies (Diptera: Psychodidae) in an ecological visitation park in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro - RJ, Brazil, and the presence of <i>Leishmania brasiliensis</i> .	07-May-2022	11-
<ul style="list-style-type: none"><li>Awaiting Reviewer Scores</li></ul>		<a href="#">View Submission</a>		
<a href="#">Contact Journal</a>		<a href="#">Cover Letter</a>		

### Anexo 3 Tabela de avaliação do hábito alimentar

Amostras	Sequencia	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
5F	GGTAAAGAAAAACCAAAATGCTGTAAGCTATGA AGGTAATAGTAGGATAATTGCGATGTTTCAAGTTTCT AGGAAGACGGCCCGAAATATAACATAAAAAATGTGA AGAAAAAGGAAAAACAA	SEM SIMILARIDADE SIGNIFICANTE								
5R	CGGGGCTTTTACTGGGCTCTGCCTAGCAATACAAATT CTTACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATGAG AACAAACAGCCTTTTCATCTGTAACACATCTGCCG AGACGAAAAATAAGGCTGATTAATTCGATATCTACA CGCCAACGGCGCATCTCTATTCTTTATATGCCTTTACC TCCACTTCTCTCAGAGGCTTGACTACGGCTCATACA CTTTCCTAGAAACTTGAAACATCGGAATTATCCTACT ATTCTCCGTCATAGCTACAGCATTTATAGGCTACGTC CTACCATGATGACAAATATCAT	Dasypus septemcinctus voucher ISEM_T-3002 mitochondrion, complete genome	Dasypus septemcinctus (TATU-MIRIM)	492	49200%	97%	9,00E-135	95.24%	16683	KT818546.1
50F	TTTTGAGAAATTCCTATATAATGCTGCTATATGAC GGTGAATAGTAGGATAATCCGATGTTTCTGTTTTTC TAGGAAAAAGGGTCAAAGTGGTAGTATATCCTCGGC CTTGTGGACTCCCAAATTA AAAAGGAG	SEM SIMILARIDADE SIGNIFICANTE								
50R	TGGGGGTCTTTATTGGGGTCTTTGCCTAGTATACAA TTTACTAACAGGAATTTCTAGCAATAAAAATACT GAAAAACGGGAAAAGAATATAATATGTACTACAC TGCGAACCCTTTTAAAAA	SEM SIMILARIDADE SIGNIFICANTE								
58F	RUIM NAO ABRE									
58R	GGGCTTGTTATAGGGTCTTTGTTGATTTATCCATTATT AACTGGAATTTTGCAGCTATACATTATACTGAAGAA AACCTAAAAGCAATTATTAGATAACCTTATTGTCGA GATAAATTAGGAGGGGACGA	SEM SIMILARIDADE SIGNIFICANTE								

66F	TTAAGCCGTGCTATAATGCTGTAGCTATGACGGTGA ATAGTAGGATAATCCGATGTTTCAAGTTTCTAGGAA AGAAGAGGGAGCCGTAGTACAAGCCTCGGCCAATG TGGAGGTACATTTAAAAAAGAATAGAGATGCGC CGTTGGCGTGTAGATATCGAATTAATCAGCCGTAGTT TACGTCTCGGTTTTCTTTTCAGAGAA	Dasypus septemcinctus voucher ISEM_T-3002 mitochondrion, complete genome	Dasypus septemcinctus	259	259	87%	6,00E-65	92.82%	16683	KT818546.1
66R	CGGGCTATTACTGGGCATCTGCCTAGCAATACAAATT CTTACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCAG ACACCATAACAGCCTTTTCATCTGTAACACTCACATCTG CCGAGACGTAAACTACGGCTGATTAATTCGATATCT ACACGCCAACGGCGCATCTCTATTTTATATGCCTTT ACCTCCACATTGGCCGAGGCTTGACTACGGCTCATA CACTTTCTAGAACTTGAAACATCGGAATTATCCTA CTATTACCGTCATAGCTACAGCATTTATAGGCTACG TCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAG	Dasypus septemcinctus voucher ISEM_T-3002 mitochondrion, complete genome	Dasypus septemcinctus	593	593	99%	3,00E-165	99.69%	16683	KT818546.1
68F	GTAAGCGTGTCTATAAATGCTGTAGCTATGACGG TGAATAGTAGGATAATCCGATGTTTCAAGTTTCTAG GAAAGAGAAAAGAGCCGTAGTAAAGCCTCGGCCAA TGTGGAGGTACCTTTAAATAAAG	Dasypus septemcinctus voucher ISEM_T-3002 mitochondrion, complete genome	Dasypus septemcinctus	169	169	80%	6,00E-38	95.33%	16683	KT818546.1
68R	CGGGCTCTAATGGGCATCTGCCTAGCATACAAATTC TTACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCAGA AAACACAGCCTTTTCATCTGTAACACTCACATCTGCCGA GAGTAAACTACGGCTGATTAATTCGATATCTACACG CCAACGGCGCATCTCTATTTTATATGCCTTTACCTC CACATTTCCAGAGGCTTGACTACGGCTCATACT TTCCTAGAACTTGAAACATCGGAATTATCCTACTAT TCACCGTCATAGCTACAGCCTTTATAGGCTACGACCT ACCATGAGGACAAATATTC	Dasypus septemcinctus voucher ISEM_T-3002 mitochondrion, complete genome	Dasypus septemcinctus	501	501	98%	2,00E-137	95.58%	16683	KT818546.1

**ANEXO 4 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES IDENTIFICADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO DISTRIBUÍDAS POR MUNICÍPIOS E LOCALIDADES.**

<b>Gênero:</b>	<b>Espécie</b>	<b>Município</b>	<b>Localidade</b>	
<i>Bichromomyia</i> spp.	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande	
<i>Brumptomyia</i> spp.	<i>Brumptomyia avellari</i>	Carmo	Fazenda são José	
		Angra dos Reis	Camorim	
		Paraty	São Roque	
		Paraty	São Roque	
		Angra dos Reis	Camorim	
	<i>Brumptomyia brumpti</i>	Carmo	Fazenda são José	
		Cantagalo	Cantagalo	
		Sumidouro	Caverna de São Caetano	
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia	
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
	<i>Brumptomyia cardosoi</i>	Sumidouro	rocha de São Caetano	
		Carmo	Fazenda são José	
	<i>Brumptomyia cunhai</i>	Paraty	São Roque	
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba	
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca	
	<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande	
		Carmo	Fazenda são José	
		Angra dos Reis	Camorim	
		Paraty	São Roque	
Paraty		São Roque		
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	Angra dos Reis	Camorim		
	Carmo	Fazenda são José		
	Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica		
	Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca		
<i>Evandromyia</i> spp.	<i>Evandromyia (Aldamyia) lenti</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande	
		Carmo	Fazenda são José	
	<i>Evandromyia (Barrettomyia) edwardsi</i>	<i>Evandromyia (Aldamyia) termitophila</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande
		Cantagalo	Cantagalo	
		Rio de Janeiro	Campo Grande	
		Saquarema	Saquarema	
		Rio de Janeiro	Camorim	
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba	
		Angra dos Reis	Camorim	
		Sumidouro	Caverna de São Caetano	
Piraí	Vale do Paraíba			
Rio de Janeiro	Grumari			
Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba			

		Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
		Angra dos Reis	Camorim
		Sumidouro	rocha de São Caetano
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu
		Mangaratiba	Sahi
		Angra dos Reis	Ilha Grande
	<i>Evandromyia (Barrettomyia) sallesi</i>	Rio de Janeiro	Campo Grande
		Rio de Janeiro	Caju
		Saquarema	Saquarema
		Rio de Janeiro	Camorim
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Piraí	Vale do Paraíba
		Rio de Janeiro	Grumari
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu
	<i>Evandromyia (Barrettomyia) tupynambai</i>	Sumidouro	Caverna de São Caetano
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
		Sumidouro	rocha de São Caetano
		Angra dos Reis	Ilha Grande
	<i>Evandromyia cortellezii</i>	Carmo	Fazenda são José
		Cantagalo	Cantagalo
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
	<i>Evandromyia edwardsi</i>	Mangaratiba	Mangaratiba
	<i>Evandromyia lenti</i>	Cantagalo	Cantagalo
	<i>Evandromyia monticola</i>	Carmo	Fazenda são José
	<i>Evandromyia rupicola</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande
<i>Expapillata</i> spp.	<i>Expapillata firmatoi</i>	Rio de Janeiro	Campo Grande
		Saquarema	Saquarema
		Rio de Janeiro	Camorim
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Piraí	Vale do Paraíba
		Rio de Janeiro	Grumari
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu
		Angra dos Reis	Ilha Grande
<i>Lutzomyia</i> spp.	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Rio de Janeiro	Caju
		Saquarema	Saquarema
		Piraí	Vale do Paraíba
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba

		Mangaratiba	Ilha da Marambaia	
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca	
		Saquarema	Rio Bonito	
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu	
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
		Angra dos Reis	Ilha Grande	
<i>Martinsmyia</i> spp.	<i>Martinsmyia gasparviannai</i>	Sumidouro	Caverna de São Caetano	
		Sumidouro	rocha de São Caetano	
<i>Micropygomyia</i> spp.	<i>Micropygomyia (Sauromyia) quinquefer</i>	Carmo	Fazenda são José	
		Cantagalo	Cantagalo	
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia	
		Paraty	São Roque	
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
		<i>Micropygomyia capixaba</i>	Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		<i>Micropygomyia firmatoi</i>	Mangaratiba	Ilha da Marambaia
	<i>Micropygomyia schreiberi</i>		Cantagalo	Cantagalo
			Mangaratiba	Mangaratiba
			Mangaratiba	Ilha da Marambaia
			Paraty	São Roque
			Paraty	São Roque
			Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
			Mangaratiba	Sahi
	Angra dos Reis	Ilha Grande		
<i>Migonemyia</i> spp.	<i>Migonemyia migonei</i>	Carmo	Fazenda são José	
		Cantagalo	Cantagalo	
		Mangaratiba	Mangaratiba	
		Rio de Janeiro	Campo Grande	
		Saquarema	Saquarema	
		Rio de Janeiro	Camorim	
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba	
		Angra dos Reis	Camorim	
		Sumidouro	Caverna de São Caetano	
		Piraí	Vale do Paraíba	
		Rio de Janeiro	Grumari	
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba	
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia	
		Paraty	São Roque	
		Paraty	São Roque	
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca	
		Angra dos Reis	Camorim	
		Sumidouro	rocha de São Caetano	
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu	
Mangaratiba	Sahi			
Angra dos Reis	Ilha Grande			



		Seropédica	São Miguel
		Seropédica	Santa Sofia
		Seropédica	Valão das Louças
		Seropédica	Fazenda Caxias
		Seropédica	Campo lindo
<i>Nyssomyia</i> spp.	<i>Nyssomyia intermedia</i>	Carmo	Fazenda são José
		Cantagalo	Cantagalo
		Mangaratiba	Mangaratiba
		Seropédica	São Miguel
		Seropédica	Santa Sofia
		Seropédica	Valão das Louças
		Seropédica	Fazenda Caxias
		Seropédica	Campo lindo
		Rio de Janeiro	Campo Grande
		Saquarema	Saquarema
		Rio de Janeiro	Camorim
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Angra dos Reis	Camorim
		Sumidouro	Caverna de São Caetano
		Piraí	Vale do Paraíba
		Rio de Janeiro	Grumari
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
	Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica	
	Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca	
	Angra dos Reis	Camorim	
	Sumidouro	rocha de São Caetano	
	Rio Bonito	Macacu-Caceribu	
	Mangaratiba	Sahi	
	Angra dos Reis	Ilha Grande	
	<i>Nyssomyia whitmani</i>	Carmo	Fazenda são José
		Cantagalo	Cantagalo
		Mangaratiba	Mangaratiba
		Seropédica	Valão das Louças
		Seropédica	Campo lindo
		Angra dos Reis	Camorim
Sumidouro		Caverna de São Caetano	
Paraty		São Roque	
Paraty		São Roque	
Angra dos Reis		Camorim	
Sumidouro		rocha de São Caetano	
Mangaratiba		Sahi	
<i>Pintomyia</i> spp.		Angra dos Reis	Camorim

	<i>Pintomyia (Pifanomyia) monticola</i>	Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Angra dos Reis	Camorim
		Mangaratiba	Sahi
	<i>Pintomyia bianchigalatae</i>	Mangaratiba	Mangaratiba
		Angra dos Reis	Camorim
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
		Mangaratiba	Sahi
	<i>Pintomyia fischeri</i>	Carmo	Fazenda são José
		Cantagalo	Cantagalo
		Mangaratiba	Mangaratiba
		Seropédica	Valão das Louças
		Saquarema	Saquarema
		Rio de Janeiro	Camorim
		Rio de Janeiro	Barra de Guaratiba
		Angra dos Reis	Camorim
		Piraí	Vale do Paraíba
		Rio de Janeiro	Grumari
		Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica
		Angra dos Reis	Camorim
		Rio Bonito	Macacu-Caceribu
	Mangaratiba	Sahi	
	<i>Pintomyia monticola</i>	Mangaratiba	Mangaratiba
	<i>Pintomyia pessoai</i>	Mangaratiba	Mangaratiba
		Seropédica	São Miguel
		Seropédica	Valão das Louças
		Seropédica	Campo lindo
Angra dos Reis		Camorim	
Paraty		São Roque	
Paraty		São Roque	
Angra dos Reis		Camorim	
Mangaratiba	Sahi		
<i>Psathyromyia (Forattiniella) aragoai</i>	Carmo	Fazenda são José	
	Cantagalo	Cantagalo	
	Angra dos Reis	Camorim	
	Paraty	São Roque	
	Angra dos Reis	Camorim	
	<i>Psathyromyia (Forattiniella) barrettoii barrettoii</i>	Angra dos Reis	Camorim
		Paraty	São Roque

		Paraty	São Roque
		Angra dos Reis	Camorim
	<i>Psathyromyia (Forattiniella) lutziana</i>	Carmo	Fazenda são José
	<i>Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata</i>	Paraty	São Roque
	<i>Psathyromyia (Psathyromyia) lanei</i>	Carmo	Fazenda são José
		Paraty	São Roque
		Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
	<i>Psathyromyia (Psathyromyia) pelli</i>	Mangaratiba	Ilha da Marambaia
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica
		Angra dos Reis	Ilha Grande
	<i>Psathyromyia (Psathyromyia) shannoni</i>	Angra dos Reis	Camorim
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Angra dos Reis	Camorim
	<i>Psathyromyia pascalei</i>	Mangaratiba	Sahi
		Paraty	São Roque
	<i>Psathyromyia shannoni</i>	Angra dos Reis	Ilha Grande
		Mangaratiba	Mangaratiba
<i>Psychodopygus</i> spp.	<i>Psychodopygus (Psychodopygus) ayrozai</i>	Carmo	Fazenda são José
		Angra dos Reis	Camorim
		Paraty	São Roque
		Paraty	São Roque
		Angra dos Reis	Camorim
		Mangaratiba	Sahi
		Angra dos Reis	Ilha Grande
	<i>Psychodopygus (Psychodopygus) davisi</i>	Carmo	Fazenda são José
	<i>Psychodopygus arthuri</i>	Paraty	São Roque
	<i>Psychodopygus ayrozai</i>	Mangaratiba	Mangaratiba
	<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	Carmo	Fazenda são José
	<i>Psychodopygus hirsutus</i>	Sumidouro	Caverna de São Caetano
		Rio de Janeiro	Campus FIOCRUZ Mata Atlântica
Sumidouro		rocha de São Caetano	
<i>Psychodopygus lloydi</i>	Paraty	São Roque	
<i>Sciopemyia</i> spp.	<i>Sciopemyia microps</i>	Niterói/ Maricá	Parque Estadual da Serra da Tiririca
		Angra dos Reis	Ilha Grande
	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Carmo	Fazenda são José
		Cantagalo	Cantagalo