



ANAIS do 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia

Curitiba - Paraná, 26 a 29 de julho de 2023



O artigo a seguir é parte integrante dos Anais do 37º Congresso Brasileiro de Espeleologia, disponível gratuitamente em www.cavernas.org.br.

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

MORELLI, L. C.; LIMA, G. C.; CHAVES JÚNIOR, S. P.; QUARESMA, P. F.; DIAS, F. G. G.; RODRIGUES, M. A.; CALDAS, L. G. M.; MENDONÇA, R. P.; ANDRADE, A. J.. Composição da fauna de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) e circulação de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em uma caverna turística no município de Altinópolis, estado de São Paulo. In: MISE, K. M.; GUIMARÃES, G. B.. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 37, 2023. Curitiba. *Anais...* Campinas: SBE, 2023. p.061-069. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais37cbe/37cbe_061-069.pdf>. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.
Consulte outras obras disponíveis em www.cavernas.org.br

COMPOSIÇÃO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E CIRCULAÇÃO DE *LEISHMANIA* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) EM UMA CAVERNA TURÍSTICA NO MUNICÍPIO DE ALTINÓPOLIS, ESTADO DE SÃO PAULO

COMPOSITION OF THE SAND FLY FAUNA (DIPTERA: PSYCHODIDAE)
AND *LEISHMANIA* CIRCULATION (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) IN A
TOURISTIC CAVE FROM ALTINÓPOLIS MUNICIPALITY, SÃO PAULO STATE

Letícia Cristina MORELLI (1); Guilherme Cecílio LIMA (2); Salvador Paganella CHAVES JÚNIOR (1); Patrícia Flávia QUARESMA (3); Fernanda Gosuen Gonçalves DIAS (2); Marcela Aldrovani RODRIGUES (2); Lizandra Guidi Magalhães CALDAS (2); Rafael Paranhos de MENDONÇA (2), Andrey José de ANDRADE (1)

(1) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR); (2) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade de Franca (UNIFRAN); (3) Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Contatos: andreyandrade@ufpr.br; rafael.mendonca@unifran.edu.br.

Resumo

Cavernas permitem o desenvolvimento de espécies de flebotomíneos e a presença de vertebrados possibilita a circulação de patógenos transmitidos pelas fêmeas. Investigou-se a fauna de flebotomíneos na Gruta do Itambé e detectou-se a presença de DNA de *Leishmania*. Coletas foram realizadas utilizando armadilhas CDC (2021 a 2022) no interior e entorno da caverna. Tórax e abdômen das fêmeas foram utilizados para extração do DNA e amplificação das sequências via PCR. Foram capturados 1.332 espécimes de flebotomíneos distribuídos em 15 espécies. *Lutzomyia longipalpis* foi a mais abundante (73,5%), seguida por *Lutzomyia itambe* (8,0%) e *Brumptomyia avellari* (4,7%). Ao todo, 133 fêmeas foram dissecadas e agrupadas em 30 pools de dois a 10 espécimes para detecção de DNA de *Leishmania*. Foram positivos dois pools de *Lu. longipalpis*, um de *Evandromyia lenti* e um de *Brumptomyia* sp. A presença de *Leishmania* em *Lu. longipalpis*, reforça a necessidade de vigilância epidemiológica para as leishmanioses nessa área de ecoturismo.

Palavras-Chave: Ecologia de vetores; Cavidade Natural; Phlebotominae; Leishmanioses.

Abstract

Caves support the development of different sandfly species, and the presence of vertebrates enable the circulation of several pathogens carried by females. Was investigated the sandfly fauna in the “Gruta do Itambé” and detect the presence of *Leishmania* DNA. Collections were carried out using CDC light traps (2021 at 2022) inside and around of the cave. For females, torax and abdomen were used for DNA extraction and amplification of sequences by PCR. 1,332 specimens of sand flies were caught belongs to 15 species. *Lutzomyia longipalpis* was most abundant (73.5%), followed by *Lutzomyia itambe* (8.0%), and *Brumptomyia avellari* (4.7%). In all, 133 females were dissected and grouped in 30 pools of two at 10 specimens for *Leishmania* DNA detection. Two pools of *Lu. longipalpis* were positive, one of *Evandromyia lenti* and one of *Brumptomyia* sp. The presence of *Leishmania* in *Lu. longipalpis* reinforce that is need entomological surveillance for leishmaniasis in this ecotourism area.

Keywords: Vector ecology; Natural cavity; Phlebotominae; Leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) são um grupo diverso de insetos que realizam seu ciclo biológico no solo, em locais úmidos e sombreados (FORATTINI, 1973; AGUIAR; VIEIRA, 2018). Nesse contexto, o elevado número de espécies que

vem sendo observado em cavernas no Brasil pode estar correlacionado a esse ciclo, uma vez que suas larvas podem utilizar o material vegetativo carreado para a cavidade, o guano de morcegos e aves, excretas de outros vertebrados, carcaças e o exoesqueleto de invertebrados como fontes de alimento (ANDRA-

DE *et al.*, 2022). Ainda, as várias compartimentações no interior das cavernas com distintos substratos também poderiam servir de criadouros ou de refúgio para as formas aladas destes insetos (GALATI *et al.*, 2003; 2006). Recentemente, demonstrou-se que fêmeas de flebotomíneos do gênero *Sciopemyia* se alimentam de animais de sangue frio (anuros) no interior de cavernas (COSTA *et al.*, 2021).

Das 290 espécies de flebotomíneos que ocorrem no Brasil, 114 (39%) já foram encontradas em cavidades naturais subterrâneas (ANDRADE *et al.*, 2022; DUTRA-RÊGO *et al.*, 2022). Os estudos com esse grupo de insetos estão associados ao fato de serem vetores de diversos patógenos para vertebrados, incluindo o ser humano, como bactérias, vírus e os mais estudados, protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses (QUARESMA *et al.*, 2012; RANGEL *et al.*, 2018). As leishmanioses são, classicamente, distinguidas em duas formas clínicas correlacionadas ao tropismo parasito-célula, sendo descritas como leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (OMS, 2022).

Em 2021 e 2022 o estado de São Paulo notificou 61 casos de LV e 140 casos de LT, em humanos, respectivamente (BRASIL, 2023). O município de Altinópolis, localizado no estado de São Paulo, faz parte da mesorregião de Ribeirão Preto e possui cobertura vegetal predominante de remanescentes de Mata Atlântica e Cerrado. Embora no município não haja casos de leishmanioses em humanos, a atenção em saúde deve ser reforçada uma vez que notificações dessas doenças são registradas em outros municípios da mesorregião (BRASIL, 2023).

Em Altinópolis, a Gruta do Itambé, de formação arenítica, é um dos mais importantes pontos turísticos do município e apresenta um considerável nível de visitação por profissionais e turistas, fato que ressalta a necessidade de estudos para o monitoramento da fauna presente, que pode estar intimamente relacionada ao risco de zoonoses para o público em geral (SARDINHA *et al.*, 2007; DUTRA-RÊGO *et al.*, 2022). Assim o objetivo do presente estudo foi inventariar a fauna de flebotomíneos de uma caverna turística e analisar a circulação de *Leishmania* nas espécies.

2. METODOLOGIA

2.1. Área de estudo

O presente estudo foi realizado em área de ecoturismo no interior e entorno da Gruta do Itambé (21°04'08"S, 47°26'15"O) (Figura 1/Anexo 1), lo-

calizada no município de Altinópolis, estado de São Paulo, Brasil. A gruta apresenta 355 m de desenvolvimento horizontal.

2.2. Coleta dos Flebotomíneos

As atividades foram autorizadas por licença expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO/ autorização federal 82359-1). Foram realizadas 22 coletas sistematizadas durante três dias consecutivos, uma vez por mês, entre março de 2021 e dezembro de 2022, utilizando nove armadilhas luminosas automáticas do tipo CDC (Figura 1D/Anexo 1), instaladas em pontos previamente selecionados. As armadilhas foram posicionadas a uma distância de, no mínimo, 10 metros umas das outras, a 1,5 metros de altura e operaram entre 17:00 horas e 05:00 horas, totalizando um esforço amostral de 7.128 horas de captura.

As armadilhas foram distribuídas entre os pontos (P): P1 e P2 na extremidade oposta a entrada da caverna (zona afótica), P3 e P4 na região central interna (penumbra) P5 e P6 na entrada da caverna, P7 e P8 a aproximadamente 100 metros da entrada e P9 a 400 metros da entrada da caverna.

2.3. Acondicionamento, montagem e identificação

Os flebotomíneos foram armazenados em microtubos rotulados contendo etanol 70%, refrigerados e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para identificação específica, todos os flebotomíneos coletados foram clarificados conforme Forattini (1973). Os machos foram montados inteiros em lâmina e lamínula com Bálsamo de Canadá. As fêmeas foram dissecadas retirando a cabeça e os três últimos segmentos do abdômen para montagem e identificação; o restante do corpo (tórax, asas, pernas e parte do abdômen) foram acondicionados em tubos contendo etanol 70% e estocados a -20°C para realização das análises moleculares (SALES *et al.*, 2020). Os flebotomíneos foram identificados utilizando a classificação proposta de Galati (2018) e a abreviação dos gêneros segue Marcondes *et al.* (2007).

Algumas fêmeas do gênero *Brumptomyia* foram identificadas apenas a nível genérico, pois os tórax, usados na identificação específica, foram priorizados nas análises moleculares.

2.4. Extração e amplificação de DNA de *Leishmania*

Para a extração do material genômico foram

utilizadas somente as fêmeas, com o objetivo de observar a presença de DNA de *Leishmania*. Os espécimes foram agrupados em pools de 2 a 10 fêmeas, selecionados em relação ao ponto, armadilha, espécie e data da coleta (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005) e enviados para o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina para realização dos processos moleculares.

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial QUIAGEN DNASY®, seguindo as especificações do fabricante. Após a extração, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR convencional, tendo como alvos as sequências de DNA de *Leishmania* de forma específica para os genes de Kdna: 150 e 152 gerando um produto de 120 pb. (SAMBROOK *et al.* 2001).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio e posteriormente observados em transiluminador de luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 1.332 flebotomíneos, sendo 960 machos (72,1%) e 372 fêmeas (27,9%) (Razão sexual M:F = 2,6: 1), distribuídos em 8 gêneros e 15 espécies: *Brumptomyia avellari* (4,7%), *Br. brumpti* (3,4%), *Br. guimaraesi* (0,7%), *Br. pintoii* (2,6%), *Pintomyia fischeri* (0,1%), *Evandromyia cortelezii* (0,2%), *Ev. carmelinoi* (0,1%), *Ev. sallesi* (0,3%), *Ev. lenti* (0,6%), *Lutzomyia itambe* (8,0%), *Lutzomyia longipalpis* (73,5%), *Psathyromyia lutziana* (0,3%), *Sciopemyia sordellii* (1,1%), *Nyssomyia whitmani* (0,1%), e *Migonemyia migonei* (0,1%). (Tabela 1/ Anexo 2). A fauna de flebotomíneos da Gruta do Itambé apresentou número maior de espécies do que estudos realizados em cavernas no mesmo estado (GALATI *et al.*, 2010). O predomínio de machos pode estar relacionado à atração pela luz das armadilhas, os quais são geralmente mais capturados por esse método quando comparados às fêmeas (BARATA *et al.* 2008; TEODORO *et al.*, 2021). *Brumptomyia guimaraesi* foi registrada pela primeira vez em uma caverna brasileira (ANDRADE *et al.* 2022). *Lutzomyia itambe* é uma espécie nova recentemente descrita, próxima a *Lutzomyia dispar* e *Lutzomyia fonsecai*, (CHAVES-JÚNIOR *et al.*, 2023). Algumas espécies do gênero *Pintomyia* só puderam ser identificadas a nível subgenérico pois as pernas utilizadas para identificação seguiram para as análises moleculares. Possivelmente se trata de *Pi. mamedei* ou *Pi. christenseni*/*Pi. damascenoi*, sendo as fêmeas dessas últimas indistinguíveis (GALATI, 2018).

A correlação dos pontos de captura com as espécies encontradas e suas características de especialização ao habitat cavernícola foi dada a partir da observação do número de espécimes encontrados por ponto de captura. No ponto P6, localizado na entrada da caverna, foi coletado o maior número de espécimes (523), seguido pelo P9 (externo a 400 m da entrada) e pelo P3 (penumbra) com 141 e 140 espécimes, respectivamente. O P8 (a 100 metros da entrada) foi o que apresentou o menor número de flebotomíneos capturados (38).

A espécie *Lu. longipalpis* foi observada em todos os pontos estudados, a qual poderia ser provavelmente caracterizada, na Gruta do Itambé, como troglóxena, devendo sair da caverna para completar seu ciclo de vida. O encontro de *Lu. longipalpis* é frequente no interior ou áreas próximas a cavernas (CAMPOS *et al.*, 2020; TEODORO *et al.*, 2021; SERRA e MEIRA *et al.*, 2022). A presença de *Lu. longipalpis* na área de estudo e essa plasticidade ambiental merecem atenção, visto que é uma espécie antropofílica e principal vetora de *Leishmania infantum*, o agente causador da leishmaniose visceral (OMS, 2022). *Lutzomyia longipalpis* pode ser encontrada em ambientes preservados (GALATI *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2017) e em áreas totalmente urbanizadas, principalmente associada a abrigos de animais domésticos no peridomicílio de residência (BARATA *et al.*, 2008). Acreditamos que cavernas utilizadas para visitas turísticas com a presença de *Lu. longipalpis* geram um alerta para uma possível participação no ciclo enzoótico da LV, visto que esta espécie de flebotomíneo está circulando entre animais silvestres e seres humanos, que frequentemente, adentram ou estão próximos à Gruta do Itambé.

Os gêneros *Brumptomyia* e *Evandromyia* foram os que apresentaram maior diversidade de espécies. As espécies pertencentes ao gênero *Brumptomyia* estão associadas a tocas de animais silvestres e não apresentam antropofília relatada ou correlação com a transmissão de *Leishmania* (FORATTINI, 1973; AGUIAR; VIEIRA, 2018). No presente estudo, as espécies deste gênero foram observadas em pontos internos e externos da caverna. O gênero *Evandromyia* é observado com frequência em estudos de fauna cavernícola (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2001; BARATA *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2017). *Evandromyia lenti* foi coletada tanto na área interna como no entorno da caverna. Já *Ev. Sallesi* apenas no entorno. Ambas as espécies merecem atenção, pois já foram encontradas infectadas naturalmente com protozoários do gênero *Leishmania* e podem estar envol-

vidas no ciclo silvestre das leishmanioses (ANDRADE FILHO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2013; SARAIVA *et al.*, 2009).

Até o momento, foram analisadas 133 fêmeas a partir de 30 *pools* e foi detectado DNA de *Leishmania* em quatro *pools* (12%, n= 30) de fêmeas, sendo dois de *Lu. Longipalpis*, um de *Brumptomyia* sp., ambos capturados no ponto P6 e um de *Ev. Lenti* capturadas no ponto P8 (Tabela 2/ Anexo 3). *Evandromyia lenti* já foi observada com a presença de DNA de *Leishmania* sp. em estudo realizado por PCR, seguida da análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. ARAUJO-PEREIRA *et al.* (2020), utilizando o método descrito acima, observou a presença de DNA de *Leishmania braziliensis* nessa espécie. RÊGO *et. Al.* (2015) relataram a detecção de DNA de *Le. Infantum* em um *pool* desta espécie de flebotomíneo.

Assim como no presente estudo, ARAUJO-PEREIRA *et al.* (2020) observaram em um *pool* de fêmeas de *Brumptomyia* sp. o DNA de *Leishmania braziliensis*. Durante o estudo, os autores utilizaram o alvo de kDNA, assim como BRILHANTE *et al.* (2021) que descreveram a presença de DNA de *Leishmania* sp. a partir do mesmo alvo.

A observação de dois *pools* positivos da espécie de maior número, *Lu. Longipalpis*, nas capturas do presente estudo, adicionado à observação do ponto de maior número de capturas, demonstra um sinal de alerta para aqueles que frequentam essa caverna. Os resultados deste trabalho corroboram com estudos anteriores que descrevem a infecção natural desta espécie para o DNA de *Leishmania* (SILVA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; MICHALSKY *et al.*, 2011).

As espécies de *Leishmania* circulantes na Gruta do Itambé ainda serão identificadas por meio de sequenciamento. Porém, a presença desses protozoários nas espécies de flebotomíneos, principalmente *Lu. Longipalpis*, reforça a necessidade de vigilância

epidemiológica nessa área de estudo.

4. CONCLUSÕES

Considerando a ocorrência de espécies de flebotomíneos vetoras e permissivas, assim como a detecção de DNA de *Leishmania* e o potencial turístico da Gruta do Itambé, reforça-se a necessidade de mais estudos na área, bem como a implementação de ações de vigilância e monitoramento para prever riscos de infecção a visitantes e a pesquisadores. Além disso, esses estudos contribuem com dados taxonômicos, ecológicos e epidemiológicos e uma maior compreensão da ecoepidemiologia destes insetos nesses ecótopos. Até o momento não há no Brasil, relato formalmente publicado, de pessoas (turistas e pesquisadores) sobre infecção por *Leishmania* adquirida em cavernas. Uma vez que esses ambientes funcionariam como áreas de risco para as leishmanioses, recomenda-se a implementação de medidas de proteção individual, como repelentes e roupas cobrindo todo o corpo ao entrar em cavernas. Para locais onde haja relatos de ocorrência de flebotomíneos vetores, como a Gruta do Itambé, informações sobre risco de infecção devem ser repassadas às pessoas que visitarão a mesma. Estas podem ser feitas por meio de ações de educação em saúde que visem informar sobre os riscos de infecção e os procedimentos necessários caso haja manifestações clínicas evidentes, como aquelas de leishmaniose cutânea. Nos planos de manejo de cavernas os estudos com flebotomíneos e leishmanioses, em parceria com espeleólogos e secretarias municipais e estaduais de saúde deverão ser incentivados.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 – pelas bolsas de doutorado e mestrado de Salvador P. Chaves Júnior e Guilherme C. Lima, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G.M.; VIEIRA, V.R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. In: RANGEL, E.F. & SHAW, J.J. **Brazilian Sand flies**, Springer International Publishing, Berlin, p. 251–298, 2018.
- ANDRADE-FILHO, J.D.; LIMA DA SILVA, A.C.; FALCAO, A.L. Phlebotomine sand flies in the State of Piauí, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1085–1087. 2001.
- ANDRADE FILHO JD.; GALATI EAB.; FALCÃO AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and

epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v.102: p.481-487, 2007.

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

ARAUJO-PEREIRA T.DE.; PITA-PEREIRA, D.E.; GOMES, S.M.; BOITÉ, M.; SILVA F.; PINTO I. DES., DE SOUSA R.L.T.; FUZARI, A.; DE SOUZA, C.; BRAZIL, R.; BRITTO, C. An overview of the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) followed by the detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification in the state of Acre, Amazonian Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.115, e200157, 2020.

BARATA, R.A.; ANTONINI, Y.; GONÇALVES, C.M.; COSTA, D.C.; DIAS, E.S. Flebotomíneos do Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, MG. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 226-228, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2023.

BRILHANTE A.F.; LIMA L, DE ÁVILA M.M.; MEDEIROS-SOUSA A.R; DE SOUZA J.F.; DOS SANTOS N.P.; .Remarkable diversity, new records and *Leishmania* detection in the sand fly fauna of an area of high endemicity for cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazilian Amazonian Forest. **Acta Tropica**, v.223, p.106-103, 2021.

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

CAMPOS, A.M.; DOS SANTOS, C.L.C.; STUMPP, R.; DA SILVA, L.H.D.; MAIA, R.A.; PAGLIA, A.P.; ANDRADE FILHO, J.D. Photoperiod differences in sand fly (Diptera: Psychodidae) species richness and abundance in caves in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, V. 135, p. 1–6, 2017.

CARVALHO B.M.; MAXIMO M.; COSTA W.A.; SANTANA A.L.F.; COSTA S.M.; Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. **Parasites & Vectors**, v.6: 325. 2013.

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

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

DUTRA-RÊGO, F.; FREIRE, M.L.; CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE FILHO, J.D. Revisiting the cave-dwelling sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazil: Diversity and potential role in the transmission of *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 36, p. 408–423, 2022.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. IV: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 658 pp., 1973.

GALATI, E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa. In: RANGEL, E.F.; SHAW, J.J. **Brazilian Sand flies**, Springer International Publishing, Berlin, p. 9–212, 2018.

GALATI. E.A.B.; NUNES, V.L.; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M.E.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.;

- ISHIRO, E.T.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; NAUFEL, G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, p. 283-296, 2003.
- GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; BOGGIANI, P.C.; DORVAL, M.E.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; OSHIRO, E.T.; DASMACENO-JÚNIOR, G.A. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 175-193, 2006.
- GALATI, E.A.B.; MARASSÁ, A.M.; GONÇALVES-ANDRADE, R.M.; CONSALES, C.A.; BUENO, E.M.F. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54, p. 477-487, 2010.
- MARCONDES, C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomology News**, v. 118, p. 351-356, 2007.
- MICHALSKY E.M.; GUEDES K.S.; SILVA F.O.L.; SILVA J.C.F.; DIAS C.L.F.; BARATA R.A, DIAS ES. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p. 58-62, 2011.
- NASCIMENTO J.C.; PAIVA B.R.; MALAFRONTA R.S.; FERNANDES W.D.; GALT E.A.B.; Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, p.119-122, 2007.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. OMS, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: jan. 2023.
- PITA-PEREIRA D; ALVES C.R; SOUZA M.M; BRAZIL R.P; BERTHO A.L; BARBOSA A.F e BRITTO C.C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.12, p. 905-913, 2005.
- QUARESMA, P.F.; CARVALHO, G.M.L.; RAMOS, M.C.N.F.; ANDRADE FILHO, J.D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 480-485, 2012.
- RANGEL, E.F.; LAINSON. R.; COSTA, S.M.; SHAW, J.J.; CARVALHO, B.M. Sand fly vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: RANGEL, E.F e SHAW, J.J. (eds). **Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control**. Springer International Publishing, Berlin, p. 341-380, 2018.
- RÊGO F.D.; RUGANI J.M.; SHIMABUKURO P.H.; TONELLI G.B.; QUARESMA P.F.; GONTIJO CM. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **PLoS One**, v.8; p. e0122038, 2015.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd Edition, v. 1, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SALES. K.G.S.; MIRANDA, D.E.O.; DA SILVA, F.J.; OTRANTO, D; FIGUEREDO, L.A.; DANTAS-TORRES, F. Evaluation of different storage times and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity. **Parasites & Vectors**, v.13, p. 399, 2020.
- SARAIVA L.; CARVALHO G.M.; GONTIJO C.M.; QUARESMA P.F.; LIMA A.C.; FALCÃO A.L.; ANDRADE FILHO J.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.46: p. 1159-1163, 2009.

- SARDINHA D.S.; CONCEIÇÃO F.T.; CARVALHO D.F.; CUNHA R.; SOUZA A.D.Z. Impactos do uso público em atrativos turísticos naturais no município de Altinópolis (SP). **Geociências**, v. 26, p. 161-172, 2007.
- SERRA E MEIRA, P.C.L.; ABREU, B.L.; DE ALMEIDA ZENOBIO, A.P.L.; DE CASTILHO SANGUINETTE, C.; RÊGO, F.D.; CARVALHO, G.M.L.; SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J.D. Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) and molecular detection of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in urban caves of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 59, p. 257–266, 2022.
- SILVA A.M.; DE CAMARGO N.; DOS SANTOS D.R.; MASSAFERA R.; FERREIRA A.C.; POSTAI C.; CRISTÓVÃO E.C.; KONOLSAISEN J.F.; BISELTO A.J.; PERINAZO R.; TEODORO U e GALATI E.A.B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v.37, p. 209-225, 2008.
- SILVA J.G.D.; WERNECK G.L.; CRUZ M.S.P.; COSTA C.H.N e MENDONÇA I.L. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, p.1715-1720, 2007.
- TEODORO, L.M.; CARVALHO, G.M.L.; CAMPOS, A.M.; CERQUEIRA, R.F.V.; SOUZA-SILVA, M.; FERREIRA, R.L.; BARATA, R.A. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from iron ore caves in the State of Pará, Brazil. **Subterranean Biology**, v. 37, p. 27–42, 2021

ANEXO 1

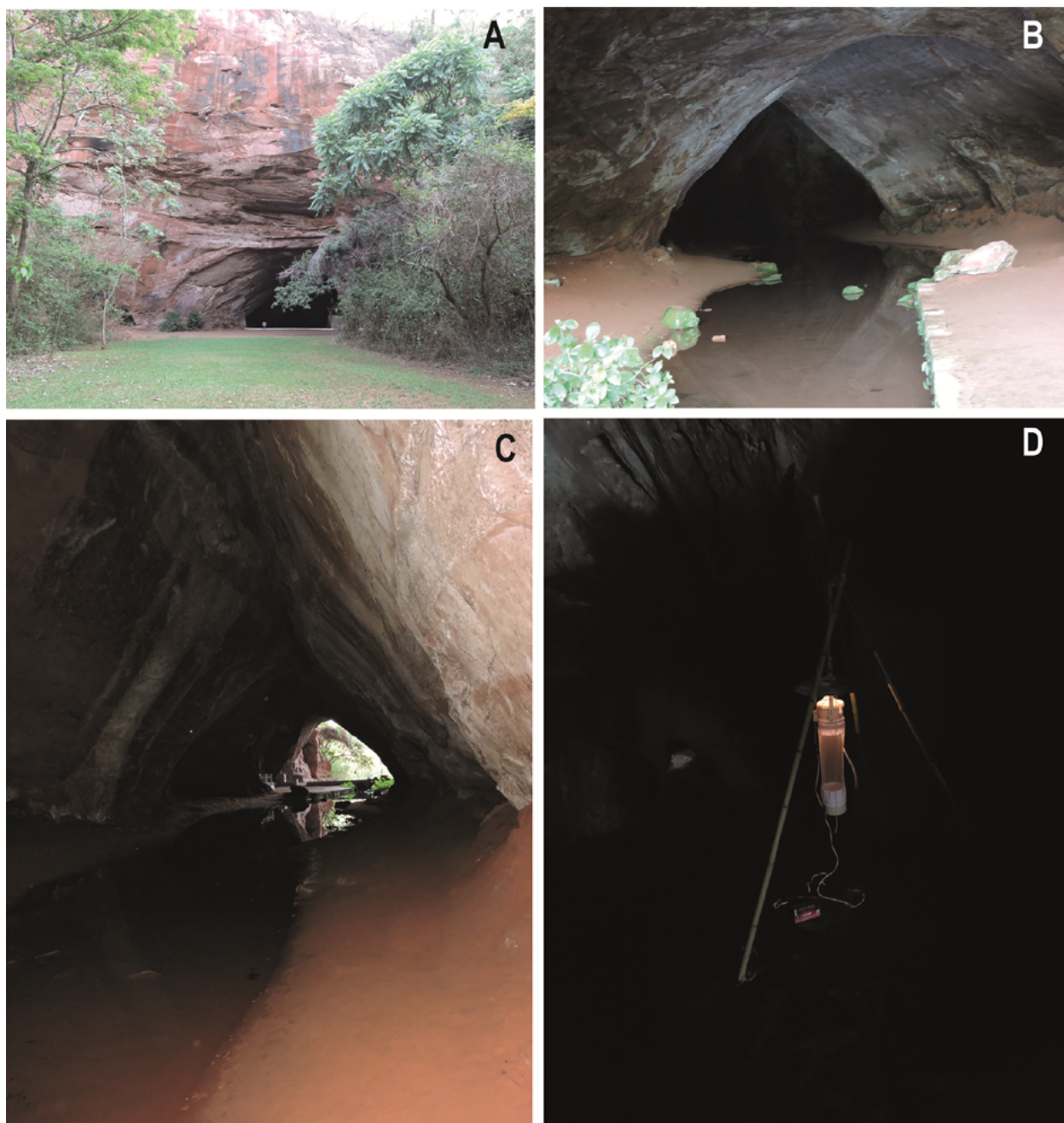


Figura 1: Área de estudo. **A)** Área externa da Gruta do Itambé, Altinópolis, São Paulo. **B/C)** Interior da Gruta do itambé. **D)** Armadilha luminosa CDC instalada no interior da caverna.

ANEXO 2

Tabela 1: Fauna de flebotomíneos coletados da Gruta do Itambé, município de Altinópolis, São Paulo (P: ponto de coleta; M: macho; F: fêmea). * espécimes.

Espécies	Pontos de Coleta																		Total		
	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9		F	M	Total
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	Total
<i>Brumptomyia</i> sp.*	3	0	1	0	3	0	1	0	1	0	4	0	24	2	9	0	4	0	50	2	52
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	9	2	22	1	10	2	12	5	57	62
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4	7	25	2	2	0	2	9	36	45
<i>Brumptomyia guimaraesi</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	4	0	2	0	0	0	0	1	8	9
<i>Brumptomyia pintoii</i>	0	1	0	7	0	0	0	0	0	4	1	5	2	14	0	0	0	0	3	31	34
<i>Pintomyia fischeri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Pintomyia</i> spp.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2	0	6	0	6
<i>Evandromyia cortelezii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	2	3
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2	1	0	0	4	3	7
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
<i>Lutzomyia itambe</i>	9	4	8	8	11	4	3	5	9	19	5	19	1	0	1	0	2	1	49	60	109
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	13	58	17	19	32	87	19	73	13	59	124	339	4	7	0	1	4	111	226	754	980
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	1	4
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0	5	1	1	1	0	0	0	0	13	2	15
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
Total	25	65	26	34	49	91	25	83	29	84	140	383	44	75	19	19	15	126	372	960	1332

Tabela 2: Fêmeas de flebotomíneos coletadas na Gruta do Itambé, município de Altinópolis, São Paulo, separadas e analisadas em pools, por espécie e pontos de coleta, para presença de DNA de *Leishmania* spp.

Espécies	Pontos de Coleta																	
	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9	
	Pools		Pools		Pools		Pools		Pools		Pools		Pools		Pools		Pools	
	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+	Nº	Nº+
<i>Brumptomyia</i> sp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	2	–	2	–	1	–
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	–	–	–	–	3	–	3	–	1	–	12	2	1	–	1	–	1	–
<i>Evandromyia lenti</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–
<i>Lutzomyia itambe</i>	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Total	1	0	0	0	3	0	3	0	1	0	13	3	3	0	4	1	2	0

Legenda: Nº = número de pools por espécie de flebotomíneo e ponto de captura; Nº+ = número de pools positivos para a presença de DNA de *Leishmania* spp. P1 a P9: pontos de captura na Gruta do Itambé, município de Altinópolis, São Paulo.