



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
COORDENAÇÃO DE BIODIVERSIDADE – CBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA – PPG-ENT

Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por
Leishmania Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em ambientes de várzea e de terra
firme no município de Tefé, Amazonas, Brasil

Antonio Marques Pereira Júnior

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

Antonio Marques Pereira Júnior

Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por
Leishmania Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em ambientes de várzea e de terra
firme no município de Tefé, Amazonas, Brasil

Orientador: Dr. Jansen Fernandes de Medeiros

Co-orientador: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

Dissertação apresentado ao Instituto
Nacional de Pesquisas da Amazônia como
parte de requisitos para obtenção de título
de Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração em Entomologia

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

*Dedico este trabalho a toda minha família,
mas duas pessoas são mais que especiais,
Antonio Marques e Lurdes Marques, pais que
sempre foram meu suporte e que me apoiaram
em cada momento e decisão. Sou o que sou
devido a vocês, amo-os eternamente.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de cursar o Mestrado e ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao Instituto Leônidas e Mario Deane, Fiocruz Amazônia, que me ofereceu todas as ferramentas e subsídios necessários para a conclusão deste trabalho.

À FAPEAM pelo auxílio financeiro para realizar as coletas e aquisição de insumos, bem como pelo financiamento de passagens para apresentação de trabalhos em congresso.

Aos Doutores Jansen Fernandes de Medeiros, Felipe Arley Costa Pessoa, não só por aceitarem o desafio de me orientar, mas principalmente pelo conhecimento que compartilharam comigo, os conselhos para vida acadêmica, e pela amizade que também foi criada ao longo do trabalho.

Ao Eric Marialva, meu coorientando de iniciação científica que participou do processo de montagem e identificação a montar e identificar o material (que não era pouco) vindo de campo, muito obrigado!

Ao Dr. Moreno Rodrigues pelo auxílio na parte estatística.

Ao Dr. Ricardo Godoi e MSc. Lilian Cantanhede por permitirem utilizar o Laboratório de Genética da Fiocruz Rondônia para parte de Biologia Molecular deste estudo.

À MSc. Carolina Teles, e Dra. Maísa Araújo por me receberem no Laboratório de Genética da Fiocruz Rondônia e me ensinar toda a parte molecular, e principalmente pela amizade que criei com vocês.

À Dra. Cláudia Rios pelo acompanhamento em discussões com artigos, ajuda nas correções do trabalho, e claro pela amizade.

À Paula Azevedo pelo acompanhamento na parte molecular e pelos momentos de descontração entre uma PCR e outra, levarei sua amizade pra sempre.

À minha família de laboratório: Jeane Cristini, Jéssica Almeida, Jordam William, Karen Bruce, Maria Oliveira, Walkyria Ramos, sem dúvida a convivência em Laboratório seria monótona sem vocês por perto.

Aos técnicos: Ricardo Mota, Diego Leite e Patrícia Dantas conviver com vocês foi ótimo principalmente pelas histórias engraçadas tanto em campo quanto em laboratório.

Às grandes amigas Emanuelle Farias, Katiane Barbosa e Val Aves, pelos laços criados desde que cheguei à Fiocruz.

À Juciane Silva que foi mais que uma irmã desde que nos conhecemos compartilhando as alegrias e tristezas da vida acadêmica e também nas discussões sobre a dissertação um do outro.

Às minhas ex-professoras Marisa Rossi, Juliana Vaz e Luciane Lopes por todo o incentivo para o ingresso no mestrado e pelo conhecimento que adquiri com vocês.

À minha turma de Entomologia de 2012 pela história construída desde o momento em que cada um chegou a Manaus, pelas gargalhadas, conversas, conhecimento e situações engraçadas. Nesses dois anos fui conhecendo cada um de vocês, e tenho a certeza que hoje são amigos que vou levar por toda a vida. Em especial aos “brothers” Diego, Leandro, Leonardo, Márlon, Patrik, Nikolas, Rafael e Sian. E às meninas Carol, Daniara, Inaura, Jeane, Karine e Tatiane.

“(...) não importa o tanto que você pode bater,
mas sim o quanto consegue apanhar e
continuar (...)”

Sylverster Stalone
(Rock IV)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
ABREVIACÕES E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais dos flebotomíneos.....	16
1.2 Fauna de flebotomíneos no Estado do Amazonas	18
1.3 Fauna de flebotomíneos em municípios da calha do Rio Solimões	19
1.4 Importância Médica dos Flebotomíneos.....	20
1.5 Leishmanioses.....	20
1.6 Infecção natural em flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	25
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVO.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Área de estudo	27
4.2 Coleta de flebotomíneos	28
4.3 Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas	32
4.4 Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) para detecção de <i>Leishmania</i> spp.	33
4.5 PCR dirigida para o Alvo hsp70 (Heat sock protein 70)	34
4.6 Visualização e confirmação de amostras positivas.....	35
4.7 RFLP (Restrição de fragmento no comprimento de polimorfismo) para produtos da região hsp70	35
4.8 Reação de sequenciamento	36

4.9	Análise dos dados	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Composição da fauna flebotomínica.....	38
5.2	Infecção Natural de Flebotomíneos por Leishmania spp.....	49
6	DISCUSSÃO.....	54
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Trichophoromyia ubiquitalis* (Mangabeira) (A) Fêmea com últimos seguimentos mais discretos conferindo um aspecto arredondado; (B) Macho com apêndices bem ornamentados nos últimos seguimentos abdominais. Fonte: Pereira Júnior, A. M..... 18
- Figura 2. (A) Mapa do Brasil evidenciando o estado do Amazonas com destaque para o município de Tefé. Fonte: Medeiros, J. F.; (B) Pontos de coletas de flebotomíneos nos ambientes de terra firme (KM 3 e KM 8) e de várzea (Comunidades: Porto Vale e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro), município de Tefé, Amazonas. Fonte: Google Earth 29
- Figura 3. Estrada da EMADE (Km 03), ponto de coleta em área de terra firme, município de Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M. 30
- Figura 4. Comunidade Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, ponto de coleta em área de várzea no município de Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M..... 30
- Figura 5. Comunidade Porto Vale, ponto de coleta em área de várzea, Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M. 31
- Figura 6. Armadilha luminosa Hoover Pugedo (HP). (A) Ecótopo Floresta. (B) Ecótopo Perdido, no município de Tefé, Amazonas. Fonte: Pereira Júnior, A. M. 31
- Figura 7. Curva de abundância de flebotomíneos em ambiente de terra firme e de várzea, coletados nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, no município de Tefé, Amazonas. 42
- Figura 8. Riqueza de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio dos ambientes de terra firme (TF) e várzea, no município de Tefé, Amazonas. 44
- Figura 9. Abundância de flebotomíneos nos meses de Janeiro, Fevereiro e Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, município de Tefé, Amazonas. 49
- Figura 10. Gel de agarose 2% corado com GelRed, mostrando produtos amplificados pela PCR kDNA com amostras de DNA extraídas de fêmeas de flebotomíneos (Tefé, AM) Canaletas: 1: controle negativo (Água ultrapura - H₂O Milli-Q); 2 a 4: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 5 a 6: *Psychodopygus davisii*; 7 a 13: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 14 15: *Psychodopygus davisii*; 16: controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 17: peso molecular de 100pb (Invitrogen)..... 51
- Figura 11. Gel de agarose 2% corado com GelRed, mostrando produtos amplificados pela hsp70 com amostras de DNA extraídas de fêmeas de flebotomíneos (Tefé, AM) Canaletas: 1: controle negativo (água ultrapura Milli-Q); 2 a 4: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 5 a 6: *Psychodopygus davisii*; 7 a 13: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 14 e 15:

Psychodopygus davisi; 16: controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 17: peso molecular de 100pb (Invitrogen)..... 51

Figura 12. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição obtidos pela técnica de PCR-RFLP utilizando as enzimas *HaeIII* e *BstUI* nas amostras de fêmeas de *Thichophoromyia ubiquitalis* capturadas no ambiente de terra firme, e cótopo floresta, no município de Tefé, Amazonas. Canaletas: 1 e 12 = pool 65; 2 e 13 = pool 4; 3 e 14 = pool 24; 4 e 15 = pool 70; 5 e 16 = pool 72; 6 e 17 = pool 77; 7 e 18 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) lainsoni*; 8 e 19 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) shawi*; 9 e 20 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) naiffi*; 10 e 21 = controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 22 = controle negativo (Água ultrapura - H₂O Milli-Q); M = Peso molecular 100 pb (Invitrogen)..... 52

Figura 13. Sequências obtidas no sequenciamento das amostras pool70_hsp70 e pool72_hsp70 alinhadas com a sequência de referencia para espécie *Leishmania (Viannia) lainsoni* depositada no GenBank (GU071176.1). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de flebotomíneos incriminados no Brasil como vetores ou suspeitos na transmissão de leishmaniose tegumentar ou visceral.	24
Tabela 2. Flebotomíneos coletados nos ambientes de terra firme e várzea no município de Tefé, Amazonas, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013.	40
Tabela 3. Valor individual de indicação (IndVal) de flebotomíneos nos ambientes de terra firme e várzea nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, no município de Tefé, Amazonas.	43
Tabela 4. Riqueza de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio dos ambientes de terra firme (TF) e várzea, no município de Tefé, Amazonas.	44
Tabela 5. Abundância de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio no ambiente de terra firme, município de Tefé, Amazonas.....	46
Tabela 6. Abundância dos Flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio no ambiente de Várzea, município de Tefé, Amazonas.	48
Tabela 7. Número de pools com suas respectivas espécies, separadas por ambiente e ecótopos, no município de Tefé, Amazonas.....	50

ABREVIACOES E SIGLAS

µL – microlitro

AIC – Criterio de informação de Akaike

AM - Amazonas

Anova – Análise de variância

BstUI – *Bacillus stearothermophilus* UI

DNA – cido desoxirribonucleico

DNTPS – Desoxirribonucleotídeos 5´fosfato

EDTA – cido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g.l. – graus de liberdade

HaeIII – *Haemophilus aegyptius* III

HP – Hoover Pugedo

hsp70 – proteína de choque térmico 70

IndVal – Valor de indicação de espécies

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

IOCL – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

kDNA – DNA do cinetoplasto

KM – quilmetro

KM² – quilmetro quadrado

KOH – Hidróxido de Potássio

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LM – Leishmaniose Mucocutânea

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mix – mistura da reação

mL – mililitro

mm – milímetros

MQ – média dos quadrados

NCBI – National Center of Biotechnology information

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR – Reação da Cadeia em Polimerase

Permanova – Análise de variância multivariada permutacional

RFLP – restrição de fragmento no comprimento do polimorfismo

RIMA – Relatório de Impactos Ambientais

RJ – Rio de Janeiro

rpm – Rotações por minuto

S – Sul

SINAN - Sistema de informações de agravos de notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde

SQ – Somas dos quadrados

TAE – Tris acetato EDTA

TF – Terra firme

TM – Taxa de infecção mínima

W – Oeste

RESUMO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) são insetos que possuem importância médica devido algumas espécies serem vetoras, tendo papel importante na transmissão das leishmanioses. Os objetivos deste trabalho foram identificar a fauna destes insetos em ambientes de terra firme e várzea, e nos ecótopos de floresta e peridomicílio, além de apontar possíveis vetores no município de Tefé, Amazonas. O levantamento da fauna foi feito durante seis meses de coletas: Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, com armadilhas luminosas tipo HP. Para verificar a infecção natural por *Leishmania* nesses insetos, foram feitos estudos de detecção molecular da presença de DNA desses parasitas. As amostras de DNA obtidas foram submetidas à Reação da Cadeia em Polimerase usando o gene kDNA e a identificação de *Leishmania* a nível específico foi feita por PCR com o gene hsp70 e posterior sequenciamento genético. No total foram coletados 5.716 indivíduos, identificados em 46 espécies pertencentes a 11 gêneros. A quantidade de machos foi ligeiramente maior em relação às fêmeas 2.868 machos (50,19%) e 2.848 fêmeas (49,81%) respectivamente. As espécies de flebotomíneos mais abundantes foram *Trichophoromyia ubiquitalis* (3.330 – 58,26%) e *Nyssomyia antunesi* (661 – 11,26%). O ambiente de terra firme obteve maior riqueza (42 espécies) em relação ao ambiente de várzea (23 espécies), sendo considerado que ambos os ambientes possuem fauna rica e diversificada. Também foi observado que os ecótopos de floresta apresentaram maior número de espécies (43 espécies) em relação ao peridomicílio (28 espécies). Pelas técnicas moleculares foi confirmada infecção de *Th. ubiquitalis* e *Psychodopygus davisi* por *Leishmania* spp. A análise de sequenciamento genético torna este trabalho o primeiro relato no estado do Amazonas de *Th. ubiquitalis* infectada por *Leishmania (Viannia) lainsoni* uma das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em humanos.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are insects that have medical importance due some species play an important role in transmission of leishmaniasis. The aims this study were to identify fauna of insects in “terra firme” (non flooded area) and “várzea” (flooded area) environments, and their ecotopes (forest and peridomicile) present in these environments, to verify possible leishmaniasis vectors in Tefé municipality, endemic area of American cutaneous leishmaniasis (ACL) Amazonas state, Brazil. The collections were done using HP light traps during six months: January, February, April, August, September and October, of 2013. To detect natural infections of *Leishmania* spp., molecular techniques were used. DNA extractions from female sandflies were performed and samples subjected to Polymerase Chain Reaction using kDNA gene, and its identification in species level were made by PCR with hsp70 gene followed by genetic sequence. In total was collected 5.716 individuals and identified 46 species. The abundance of the males was slightly higher compared to females, 2.868 males (50,19%) and 2.848 females (49,81%), respectively. *Trichophoromyia ubiquitalis* (3.330 – 58,26%) and *Nyssomyia antunesi* (661 – 11,26%) were species most abundant. “Terra firme” environment (42 species) was species richer than “várzea” environment (23 species) and forests ecotopes (43 species) were also richer than peridomiciles (28 species). The molecular techniques confirmed infection of *Th. ubiquitalis* and *Psychodopygus davisi* with *Leishmania* spp. The found sequence analysis of the *Leishmania* confirmed that the specie *Leishmania (Viannia) lainsoni* was infecting *Th. ubiquitalis*. That specie causes also ACL in Pará state. This is the first report of *L. lainsoni* infecting sand flies in Amazonas state. Amazonas state. Probably, *Th. ubiquitalis* is a species that causes in Tefé area.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são vetores de importância médica pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e são amplamente distribuídos no globo tendo ocorrência em todos os continentes, exceto Antártida (Lewis 1974). Atualmente são conhecidas mais de 900 espécies no mundo, sendo a região Neotropical a mais representativa onde são registradas cerca de 500 espécies, com 260 listadas para o Brasil, representando a maior diversidade (Shimabukuro *et al.* 2011; Shimabukuro e Galati 2011). No Brasil, o estado do Amazonas apresenta o maior número com 134 espécies registradas até o momento (Alves *et al.* 2012; Figueira *et al.* 2013, Oliveira *et al.* 2013).

Os flebotomíneos são holometábolos (ovo, larva, pupa e adulto), e os estágios imaturos ocorrem no ambiente terrestre, necessitando de locais úmidos e com matéria orgânica para seu desenvolvimento (Tesh e Guzman 1996). Os ovos possuem forma ovoide ou elipsoide (Forattini 1973; Pessoa *et al.* 2008). A larva é vermiforme com cabeça em forma capsular, possuem longas cerdas caudais de coloração escura (Mann *et al.* 2007; Pessoa *et al.* 2001; Pessoa *et al.* 2008), e passa por quatro estádios. A pupa possui cabeça e tórax formando um cefalotórax e nove segmentos abdominais, claviforme, semelhante a uma crisálida de borboleta (Brazil e Brazil 2000). Cerca de um ou dois dias antes de empupar, a larva deixa de se alimentar e procura algum suporte sólido que serve de substrato para a fixação da pupa através da última exúvia larval até a emergência do adulto (Young e Duncan 1994; Maroli *et al.* 2012).

Os adultos são pequenos, tendo seu tamanho de dois a cinco milímetros de comprimento e uma coloração que varia de amarelo claro a marrom escuro. Uma

característica marcante para reconhecê-los é a posição de suas asas, que quando em repouso ficam semieretas e entreabertas (Willians 1993; Alexander 1999). Caracterizam-se por possuir o corpo e as asas densamente cobertos por cerdas, com as pernas longas e delgadas. Fêmeas e machos possuem dimorfismo sexual, como o tamanho da probóscide que geralmente é maior na fêmea que no macho. Os últimos segmentos abdominais, no macho constitui-se de apêndices bem desenvolvidos e com genitália externa, enquanto na fêmea é mais discreto e com formato arredondado e genitália interiorizada (Figura 1).

Esses insetos possuem hábitos crepusculares ou noturnos, entretanto algumas espécies dependendo da falta de luminosidade local podem apresentar hábitos diurnos. É comum encontrá-los em bases e copas de árvores (Arias e Freitas 1977; Pessoa *et al.* 2007) e locais escuros tais como tocas e cavernas (Alves *et al.* 2011). Movimentam-se em voos saltitantes, e deduz-se que sua capacidade de dispersão é de aproximadamente 200 metros de acordo com a espécie (Alexander 1999; Casanova *et al.* 2005).

Tanto os machos como as fêmeas se alimentam de fontes ricas em açúcar, tais como seiva de plantas e secreções de afídeos (Cameron *et al.* 1995), mas somente as fêmeas realizam a hematofagia para nutrição e maturação dos folículos ovarianos (Forattini 1973; Killick-Kendrick 1999).



Figura 1. *Trichophoromyia ubiquitalis* (Mangabeira) (A) Fêmea com últimos segmentos mais discretos conferindo um aspecto arredondado; (B) Macho com apêndices bem ornamentados nos últimos segmentos abdominais. Fonte: Pereira Júnior, A. M.

1.2 Fauna de flebotomíneos no Estado do Amazonas

No Amazonas os flebotomíneos apresentam uma grande composição de espécies. Estudos apontam que as espécies *Nyssomyia anduzei* (Rozeboom), *Ny. antunesi* (Coutinho), *Ny. umbratilis* (Ward e Fraiha), *Ny. yuilli yuilli* (Young e Porter), *Psychodopygus amazonensis* (Root), *Ps. ayzoi* (Barreto e Coutinho), *Ps. chagasi* (Costa Lima), *Ps. davisii* (Root) e *Trichophoromyia ubiquitalis* (Mangabeira) tem sido as mais abundantes no estado do Amazonas (Arias e Freitas 1977; Arias e Freitas 1978; Barrett *et al.* 1996; Casttelón *et al.* 2000; Dias-lima *et al.* 2002; Alves *et al.* 2012; Ramos 2012; Rocha *et al.* 2013). Esses trabalhos demonstraram que o ambiente florestal apresenta maior diversidade de espécies, e que os flebotomíneos em geral, são abundantes neste tipo de ambiente em relação a outros ambientes (Barbosa *et al.* 2008; Cutollo *et al.* 2013), até pela relação com os diversos microambientes que favorecem estes insetos (Cabanillas e Castellón 1999; Dias-Lima *et al.* 2002; Pessoa *et al.* 2007). As florestas de ambientes de várzea até o momento tem sido pouco exploradas com relação aos estudos em flebotomíneos. Poucos trabalhos neste tipo de ambiente podem ser explicados pelas dificuldades de acessibilidade nos períodos de chuva, que

coincidem com a inundação das florestas, podendo não conferir microambientes favoráveis para os flebotomíneos devido a rela o com seu ciclo de vida; porém existe uma fauna frequente e diversificada (Rebêlo e Oliveira-Pereira 2001; Odorizzi e Galatti 2007).

Outro tipo de ambiente que vem recebendo aten o dentre as pesquisas são os ambientes peridomiciliares. Com a fragmenta o de ambientes e conseqüente destrui o de microambientes, a fuga ou morte de fontes sanguíneas dos animais silvestres faz com que algumas espécies de flebótomos procurem se adaptar em ambiente próximos de habita es humanas, caracterizados como peridomic lios, fazendo com que tais locais recebam alerta para aproxima o de vetores (Teodoro *et al.* 2001; Teodoro *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2008; Ramos 2012; Reis *et al.* 2013).

1.3 Fauna de flebotomíneos em municípios da calha do Rio Solimões

Estudos realizados na região do médio Solimões apontaram uma fauna rica destes insetos. Castellón *et al.* (2000) ao realizar coletas em áreas de influência do gasoduto no município de Coari registraram uma fauna de 50 espécies utilizando diferentes métodos de captura, sendo as espécies *Ps. chagasi*, *Ps. davis* e *Th. ubiquitous* as mais abundantes nos locais de coleta. Gomes *et al.* (2009) encontraram na mesma área do gasoduto e encontraram 25 espécies. Silva *et al.* (2007) identificaram 43 espécies sendo as mais abundantes *Ny. anduzei*, *Ps. davis* e *Ny. umbratilis* em áreas de floresta de terra firme no município de Manacapuru. Barrett *et al.* (1996) realizaram coletas no município de Tefé e obtiveram 52 espécies, sendo *Th. ubiquitous*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ny. richardwardi* as mais abundantes.

1.4 Importância Médica dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos são incriminados como transmissores de vírus (Tesh 1988; Comer e Tesh 1991), bactérias (Lewis 1974; Young e Duncan 1994), mas obtiveram grande importância em saúde pública quando foram associados como vetores das Leishmanioses (Wenyion 1911). No mundo aproximadamente 70 espécies de flebotomíneos são assinaladas na transmissão de leishmaniose (Ready 2013). No Brasil, estudos com flebotomíneos ganharam destaque a partir do trabalho de Aragão (1922), que associou a alta abundância desses insetos coincidindo com o elevado número de casos de leishmaniose no município do Rio de Janeiro. Atualmente 20 espécies tem sido implicadas como vetoras comprovadas ou suspeitas de leishmaniose no país (Lainson *et al.* 1994; Rangel e Lainson 2009) (Tabela 1).

Na região Norte do Brasil, as espécies que têm sido incriminadas como vetores de leishmaniose pertencem aos gêneros *Bichromomyia* Artemiev, *Nyssomyia* Barreto; *Psychodopygus* Mangabeira; *Lutzomyia* França e *Trichophoromyia* Barreto (Lainson e Shaw 1968; Lainson *et al.* 1976; Lainson e Shaw 1976; Silveira *et al.* 1991). No estado do Amazonas as espécies comprovadas vetoras até o momento são *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bi. olmeca nociva* (Young e Arias), *Ny. anduzei* (Mangabeira), e *Ny. umbratilis* (Arias e Freitas 1978; Arias *et al.* 1987).

1.5 Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um espectro de manifestações clínicas que podem acometer o homem quando este entra em contato com ciclo de transmissão do parasito. São classificadas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose tegumentar que nas Américas são chamadas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) essas enfermidades estão entre os

seis principais agravos no mundo, afetando entre 1,5 a 2,0 milhões de pessoas anualmente, estando presentes em 88 países (Clem 2010; WHO 2013), onde mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrentes no mundo estão em Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão e Brasil (WHO 2103). Já para a forma cutânea mais 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Arábia Saudita, Irã, Síria, Peru e Brasil (Desjeux 1996, Clem 2010).

A forma visceral da doença é considerada a mais grave, pois atinge os órgãos como fígado e baço podendo levar a pessoa acometida a óbito (Gontijo *et al.* 2003). A forma tegumentar pode variar em Leishmaniose cutânea localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LM). A LCL é caracterizada por lesões exclusivamente na pele, no ponto de inoculação do parasita, seu tratamento é rápido e é considerada a forma menos agressiva (Gontijo e Mello 2003). A LCD produz lesões crônicas e espalhadas pelo corpo, sendo as mais difíceis de cura (Moraes e Silveira 1994). A LM é definida como ulcerações nas regiões mucosas causando a destruição tecidual (Gomes *et al.* 2004).

No Brasil foram notificados 148.315 casos para a forma tegumentar e 23.633 casos para a forma visceral, entre os anos de 2007 a 2013. Deste total, na região Norte foi registrado maior proporção de casos de Leishmaniose tegumentar (40%), e a segunda região com maior registro de casos (20%) da forma visceral ficando atrás apenas da região Nordeste. Em relação aos estados da região Norte, o Amazonas corresponde com cerca de 20% dos casos notificados para LTA, já para a forma visceral existem apenas 12 casos importados de outras regiões (SINAN 2013).

Os agentes etiológicos destes agravos são protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* Ross, que dependendo da espécie causam as diferentes manifestações clínicas. Possuem duas formas: promastigota (flagelada), que

são encontradas no intestino dos flebotomíneos, e amastigotas (forma intracelular sem flagelo), que vivem obrigatoriamente no sistema fagocitário de mamíferos.

O gênero *Leishmania* é constituído por mais de 30 espécies classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Sendo que essa subdivisão está estreitamente relacionada com a forma de desenvolvimento e colonização no intestino do vetor (Lainson e Shaw 1987).

Na região Neotropical 15 espécies de *Leishmania* são causadoras de Leishmaniose (Silveira *et al.* 2004). No Brasil a forma visceral é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Shaw. A forma tegumentar é causada por outra espécie do subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis* Vianna, e espécies do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis* Vianna, *L. guyanensis* Floch, *L. lainsoni* Silveira, Souza, Lainson, Shaw, Braga e Ishikawa, *L. lindenbergi* Silveira, Ishikawa, Souza e Lainson, *L. naiffi* Lainson e Shaw, e *L. shawi* Lainson e Shaw.

Na região Norte circulam oito espécies de leishmânias: *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) lindenberg*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. No estado do Amazonas já foram registradas *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L.(V.) naiffi* (Arias e Freitas 1978; Lainson *et al.* 1994; Silveira *et al.* 2002; Silveira *et al.* 2004; Guerra *et al.* 2006), sendo *L. (V.) guyanensis* a espécie com maior número de registros (Arias e Freitas 1978; Guerra *et al.* 2006; Coelho *et al.* 2011).

O perfil clássico das áreas endêmicas de leishmanioses eram distribuídas até recentemente em áreas rurais/florestais. Porém em algumas regiões do Brasil o perfil de áreas endêmicas de leishmanioses já se encontram mudadas, com ocorrência em áreas urbanas, devido a algumas populações de flebotomíneos, como por exemplo, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) e *Ny. intermedia* (Lutz e Neiva) que vem se adaptando cada

vez mais aos ambientes peridomiciliares e urbanos (Ministério da Saúde 2006; Ministério da Saúde 2007). No estado do Amazonas o perfil para o agravo ainda é predominantemente relacionado com o ciclo silvestre, em que o homem acaba sendo fonte de infecção ao entrar em áreas florestais, sendo assim picado pelo vetor e adquirindo a doença. Embora já existam fortes evidências da ocorrência de um processo de instalação da doença em áreas semi-urbanizadas (Paes 1991; Feitosa e Castellón 2004; 2009; Barbosa *et al.* 2008).

Tabela 1. Espécies de flebotomíneos incriminados no Brasil como vetores ou suspeitos na transmissão de leishmaniose tegumentar ou visceral.

Espécies vetoras	Espécies de <i>Leishmania</i>	Referências
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Lainson e Shaw (1968)
<i>Bi. olmeca nociva</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Arias e Naiff (1987)
<i>Lutzomyia cruzi</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	Santos <i>et al.</i> (1998)
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	Deane e Deane (1954)
<i>Migonemyia migonei</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Araújo Filho (1979)
<i>Nyssomyia anduzei</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1976)
<i>Ny. antunesi</i>	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Silveira <i>et al.</i> (2002)
<i>Ny. intermedia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Aragão (1922)
<i>Ny. neivai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pita-Pereira <i>et al.</i> (2009)
<i>Ny. umbratilis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Arias e Freitas (1978)
<i>Ny. whitmani</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pessôa e Coutinho (1941)
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>	Santamaría <i>et al.</i> (2006)
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	Rangel & Lainson (2003)
<i>Ps. complexus</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Souza <i>et al.</i> (1996)
<i>Ps. davisi</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	Gil <i>et al.</i> (2003)
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Rangel <i>et al.</i> (1985)
<i>Ps. paraensis</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)
<i>Ps. squamiventris</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Souza <i>et al.</i> (1996)
<i>Ps. wellcomei</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Lainson <i>et al.</i> (1973)
<i>Th. ubiquitalis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	Silveira <i>et al.</i> (1991)

1.6 Infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp.

No Brasil, estudos com infecção natural em flebotomíneos iniciaram na região Sudeste, em pesquisas com diversas metodologias de dissecação e isolamento de parasitas de flebotomíneos, a partir da visualização de formas flageladas após a retirada do tubo digestório de fêmeas recém-capturadas. Esse método permitiu a incriminação de muitas espécies de flebotomíneos na época como *Migonemyia migonei*, *Ny withmani*, *Ny. intermedia*, *Pintomyia pessoai* dentre outras espécies (Pessôa e Coutinho 1939; Pessôa e Pestana 1940; Coutinho 1940; Forattini 1952). Na região Norte, estudos utilizando este método destacaram a incriminação de *By. flaviscutellata*, *Ny. anduzei*, *Ps. wellcomei* e *Th ubiqiutalis* como vetores de *Lesihmmania* no estado do Pará (Lainson e Shaw 1968; Lainson *et al.* 1972; Lainson *et al.* 1973; Lainson *et al.* 1976; Silveira *et al.* 1991). No estado do Amazonas, utilizando método semelhante foram encontradas as espécies *Ny. umbratilis* infectadas com formas flageladas de *L. (V.) guyanensis*, além de *Bi. flaviscultellata* e *Bi. olmeca nociva* infectadas com *L. (L.) amazonensis* (Arias e Freitas 1978; Arias *et al.* 1987).

Atualmente novas técnicas vem sendo utilizadas, tal como a técnica de Reação de cadeia da Polimerase (PCR) que possibilita a detecção e identificação mais rápida para espécies de *Leishmania*. Muitos estudos tem usado esta técnica como uma ótima ferramenta para se estimar taxas de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp. tendo em vista que a PCR tem uma alta sensibilidade e especificidade (Barket 1987; Aransay *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2006; Paiva *et al.* 2006; Paiva *et al.* 2007).

Os últimos trabalhos referentes à taxa de infecção no estado do Amazonas ainda utilizaram o método de dissecação (Pessoa *et al.* 2007; Pinheiro *et al.* 2008; Reis *et al.* 2013), este método tem o viés de as fêmeas serem processadas assim que

capturadas do campo, e além disso, as dissecações consomem muito tempo e ainda são necessárias pessoas com experiência no manuseio. A técnica PCR por outro lado permite o processamento de um elevado número de indivíduos e pode ser direcionada para um gene específico, além de detectar uma quantidade mínima de DNA de *Leishmania* (Aransay *et al.* 2000), porém poucos trabalhos tem sido utilizados no estado do Amazonas utilizando essa técnica para estimativa da taxa de infecção em flebotomíneos, e os estudos tem se restringido para identificação das espécies de *Leishmania* em casos humanos (Guerra *et al.* 2006; Coelho *et al.* 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O município de Tefé vem passando por modificações em sua configuração econômica e demográfica, devido às intensas prospecções e explorações de gás natural, propiciando o acesso da população à áreas antes não habitadas. Nos últimos sete anos foram registrados 328 casos de Leishmaniose tegumentar (SINAN 2013), dando uma média de 76,25 casos por 100 mil habitantes/ano, não muito diferente da média estadual de 86,8 (Guerra *et al.* 2006). Exemplo próximo a esse ocorreu no município de Coari, vizinho ao município de Tefé, e que registrou aumento de casos de Leishmaniose após a instalação de empresas de exploração de gás e petróleo, fazendo com que muitos trabalhadores ao adentrar em ambientes de mata ficassem expostos aos riscos de infecção (Costa *et al.* 2010).

Poucos estudos sobre a fauna flebotomínica foram realizados na região e nenhum estudo foi feito para verificar taxas de infecção natural po leishmânias nesses insetos. Levantamentos da fauna de flebótomos, aliados com estudo de capacidade vetorial servem de base para estratégias de vigilância epidemiológica.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

- Associar aspectos ecológicos da composição flebotomínica em áreas de terra firme e várzea, município de Tefé, Amazonas.

3.2 Específicos

- Realizar um levantamento da fauna de flebótomos em ambiente de terra firme e de várzea e estimar a abundância, diversidade e riqueza de espécies entre essas áreas;

- Avaliar a distribuição das espécies de acordo com os ecótopos (peridomicílio e floresta) e verificar se existe variação na diversidade e riqueza;

- Assinalar potenciais vetores de leishmaniose tegumentar na área de estudo, Tefé, Amazonas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado no município de Tefé (03°19'14.62"S; 64°43'24.90"W), Amazonas, Brasil. Tefé é um dos dez municípios que compõem a região do médio Solimões, localizado a 575 km da capital Manaus, com uma área territorial de 23.704,488 km² e população de 61.453 habitantes (IBGE 2010). O clima é classificado na escala de Köppen, como do tipo Afi, tropical chuvoso, sem estação seca (chuvas mensais acima de 60 mm), regime térmico sem estação fria, com temperaturas médias mensais acima de 18°C e oscilação anual de temperatura inferior a 5°C (EMBRAPA 1999) e precipitação pluviométrica de 2.900 mm (INMET 2013).

A vegetação é constituída na sua maior parte por floresta ombrófila densa de terras baixas que se caracteriza por não ser alagada e em terrenos ondulados, com baixas

altitudes e árvores de dossel emergente, como *Bertholletia excelsa* Humboldt e Bonpland. Um outro tipo de vegetação encontrada no município é a floresta ombrófila densa aluvial, chamada de floresta de várzea, que é uma formação ribeirinha que ocorre ao longo dos cursos d'água e possui período de inundação por águas brancas, sua formação pode ser aberta ou apresentar dossel uniforme e emergente (RIMA 2003).

4.2 Coleta de flebotomíneos

As capturas de flebotomíneos foram realizadas no ano de 2013 nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto Setembro e Outubro, em ambiente de terra firme, em dois trechos na Estrada da EMADE (Km 03 e Km 08) e em dois ambientes de várzea, comunidades Nossa Senhora do Perpétuo Socorro e Porto Vale (Figura 2). Em cada ambiente foi contemplado os ecótopos de floresta e peridomicílio. O ecótopo de floresta consistiu de uma área com vegetação primária no ambiente de terra firme e com vegetação secundária no ambiente de várzea, ambos distantes de habitações humanas, enquanto o ecótopo de peridomicílio foi caracterizado por um local parcialmente desmatado com habitações humanas e abrigos para criação de animais como galinheiros (Figura 3-6).

Em cada um dos ambientes foram instaladas 12 armadilhas luminosas do tipo Hoover Pugedo Biomédica Ltda (HP) por quatro noites, contemplando três armadilhas em cada ecótopo. As armadilhas foram colocadas a 1,5 metros de altura em relação ao solo e separadas por uma distância de 20 metros em relação à outra, permanecendo ativas por 13 horas consecutivas (17:00 às 06:00), somando um esforço amostral de 48 dias, equivalentes a 624 horas de capturas.

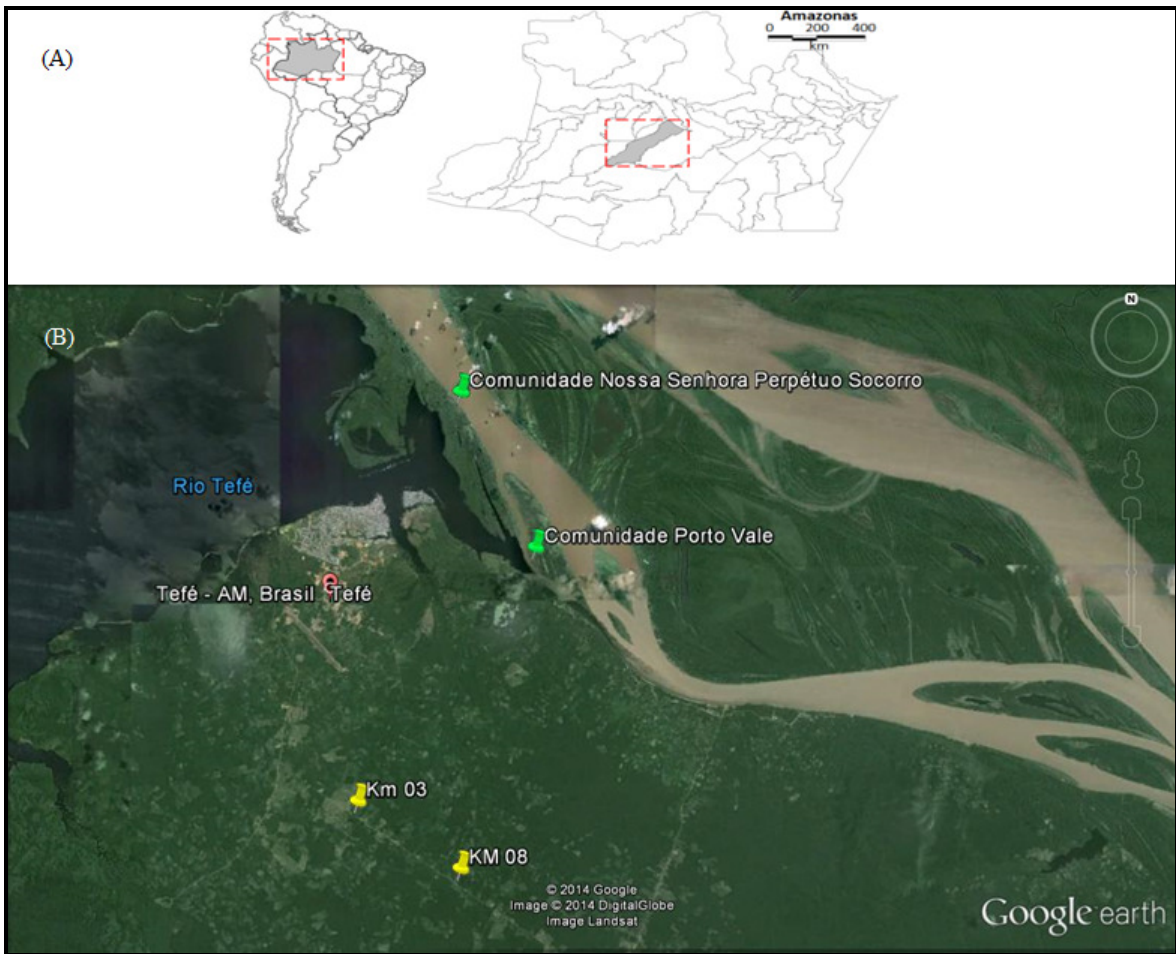


Figura 2. (A) Mapa do Brasil evidenciando o estado do Amazonas com destaque para o município de Tefé. Fonte: Medeiros, J. F.; (B) Pontos de coletas de flebotomíneos nos ambientes de terra firme (KM 3 e KM 8) e de várzea (Comunidades: Porto Vale e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro), município de Tefé, Amazonas. Fonte: Google Earth



Figura 3. Estrada da EMADE (Km 03), ponto de coleta em área de terra firme, município de Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M.



Figura 4. Comunidade Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, ponto de coleta em área de várzea no município de Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M.



Figura 5. Comunidade Porto Vale, ponto de coleta em área de várzea, Tefé-AM. Fonte: Pereira Júnior, A. M.



Figura 6. Armadilha luminosa Hoover Pugedo (HP). (A) Ecótopo Floresta. (B) Ecótopo Perdidoemílio, no município de Tefé, Amazonas. Fonte: Pereira Júnior, A. M.

Posteriormente as armadilhas foram retiradas e os flebotomíneos separados com o auxílio de aspirador tipo Castro e colocados em tubos com álcool 96% contendo as seguintes informações: local de coleta, data, ambiente e ecótopo e transportados para o Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia, no Instituto Leônidas

e Maria Deane/Fiocruz, Manaus, Amazonas, onde os insetos foram inicialmente triados para posterior identificação das espécies.

Para identificação dos flebotomíneos, primeiramente os espécimes foram separados por sexo. Os machos foram diafanizados utilizando Hidróxido de Potássio (KOH) a 10%, em seguida lavados com solução de ácido acético a 10% e água corrente e montados inteiros entre lâmina e lamínula com fluído de Berlese. As fêmeas foram dissecadas, a cabeça e a genitália clarificadas com Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% e montadas com fluído de Berlese, e o restante do corpo foi colocado em microtubo individual e armazenado em álcool 96% para realização dos procedimentos moleculares. Os flebotomíneos foram identificados morfológicamente através da observação da genitália (machos e fêmeas) utilizando chave proposta por Young e Duncan (1994), sendo adotada neste trabalho a classificação proposta por Galati (2003) e as abreviaturas dos nomes para flebotomíneos seguiu a proposta de Marcondes (2007).

4.3 Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas

Após a etapa de identificação, as fêmeas foram agrupadas em microtubo, variando entre 10 a 20 indivíduos. Os flebotomíneos foram agrupados utilizando os seguintes critérios: espécie, mês de coleta, tipo de ambiente e de ecótopo.

As extrações foram realizadas seguindo o protocolo DNeasy® Blood and Tissue Kit Qiagen. Inicialmente foi adicionado 180µL de salina tamponada com fosfato (PBS 1X) em cada *pool* e nos controles e foi feita a homogeneização com o auxílio de pistilos esterilizados. Posteriormente 20 µL de Proteinase K a 20µg/mL foram adicionados por dois minutos em temperatura ambiente para a lise das amostras. Foram colocados 200 µL de Buffer AL em cada *pool* e as amostras foram incubadas em banho Maria a 56°C *overnight*.

No dia seguinte foram adicionados 200 µL de etanol absoluto às amostras e realizado um vórtex por 15 segundos. Posteriormente, cada amostra foi transferida para minicolunas com tubos coletores e centrifugadas a 8.000 rpm por um minuto. O tubo coletor foi descartado e a minicoluna transferida para outro tubo coletor. Em seguida foi adicionado 450 µL de Buffer AW1, e as amostras foram centrifugadas novamente a 8.000 rpm por um minuto.

O tubo coletor foi descartado e a minicoluna transferida para novos tubos. Logo após foi adicionado 450 µL de Buffer AW2 e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos, o precipitado no tubo coletor foi descartado e as minicolunas foram recolocadas nos seus respectivos tubos coletores para uma nova centrifugação a 14.000 rpm por um minuto. Após a centrifugação os tubos foram descartados, e as minicolunas foram colocadas em microtubos de 2 mL e foi adicionado 30 µL de Buffer AE. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por cinco minutos para homogeneização e depois centrifugadas a 8.000 rpm por um minuto. Esse passo foi repetido e após a centrifugação as minicolunas foram descartadas e o precipitado que ficou nos microtubos de 2 mL foram armazenados em freezer a – 20°C para posterior utilização na PCR (Reação da Cadeia em Polimerase). Após a etapa de extração as amostras foram quantificadas em Nanodrop (Nanoval Plus) e verificadas a pureza do DNA. Como controles positivos foram utilizados machos de *Th. ubiquitalis* + 15 µL de *L. (L.) amazonensis* e como controles negativos apenas machos da mesma espécie ou água ultrapura.

4.4 Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) para detecção de *Leishmania* spp.

As amostras foram submetidas a uma reação dirigida para a região conservada do minicírculo de kDNA entre todas as espécies de *Leishmania* spp. de acordo com

Oliveira *et al.* (2005), onde a amplificação ocorreu para fragmento de aproximadamente 120pb, utilizando os iniciadores 5'-GGG(GT)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA-3' e 5-(G/C) (G/C) (G/C) (A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'.

A mistura da reação (mix) foi preparada com as seguintes concentrações: 18,7 µL de água ultrapura (H₂O Mili-Q); 2,5 µL de Buffer Green; 0,75 µL de MgCl₂ (2mM); 0,38 µL de *primer* de kDNA (1µmol); 0,50 µL de dNTPs (0.2mM); 0,25 µL de Taq Polimerase (1,25U); 2 µL de cada amostra extraída, totalizando um volume final de 25 µL.

A amplificação do kDNA foi realizada em aparelho termociclador (Veriti – Applied Biosystems®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C por 45 segundos (extensão da fita), e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.5 PCR dirigida para o Alvo hsp70 (Heat sock protein 70)

Para a identificação da espécie de *Leishmania* as amostras de DNA foram amplificadas por PCR utilizando como alvo o gene da proteína do choque térmico 70 (hsp70), tendo como os iniciadores Hsp 70cF 5-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e Hsp 70cR 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3' de acordo com Graça *et al.* (2012).

O mix da reação foi preparado com as seguintes concentrações: 36,25 µL de água ultrapura (H₂O Mili-Q); 5,0 µL de Buffer Green; 1,5 µL de MgCl₂ (2mM); 1,0 µL de cada *primer* hsp70 (1µmol) (forward e reverse); 2,0 µL de dNTPs (0,2mM); 0,5 µL de Taq Polimerase (1,25U); 5,0 µL de cada amostra extraída, totalizando um volume final de 52,25 µL.

A amplificação foi realizada utilizando um termociclador (Veriti – Applied Biosystems®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 33 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 58°C por 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C por 30 segundos (extensão da fita), e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.6 Visualização e confirmação de amostras positivas

Os produtos da PCR para os alvos kDNA (120pb) e *hsp70* (240pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com 1 µL de GelRed. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb, conforme instruções do fabricante. O tampão de corrida foi o TAE (Tris-acetato-EDTA) na concentração de 1X, e os géis foram submetidos a 100 volts por 25 minutos. E por fim, visualizados em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000.

4.7 RFLP (Restrição de fragmento no comprimento de polimorfismo) para produtos da região *hsp70*

Para identificação a nível específico da espécie de *Leishmania*, as amostras positivas para o alvo *hsp70* foram submetidas à PCR RFLP através da digestão por enzimas *HaeIII* (*Haemophilus aegyptius*) e *BstUI* (*Bacillus stearothermophilus*).

O mix da reação para digestão pela enzima *HaeIII* foi realizado nas seguintes concentrações: 34 µl de água ultrapura (H₂O Mili-Q), 5 µl de tampão 10X (15mM), 1,0 µl da enzima *HaeIII* e 10 µl do produto amplificado. Para a enzima *BstUI* o mix foi realizado de acordo com as seguintes concentrações: 7 µl de H₂O, 2 µl de tampão 10X (15mM), 1,0 µl da enzima *BstUI* e 10 µl do produto amplificado. As soluções foram incubadas *overnight* em diferentes temperaturas: 37°C para as amostras digeridas pela *HaeIII* e 60°C para as amostras digeridas pela *BstUI*.

Como controles para reação foram utilizadas cepas de referência das espécies *L. (L.) amazonensis* (IOCL 575), *L. (V.) braziliensis* (IOCL 566), *L. (V.) guyanensis* (IOCL 565), *L. (V.) lainsoni* (IOCL 1045), *L.(V.) naiffi* (IOCL 1365), *L. (V.) shawi* (IOCL 1545) cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ.

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida onde se aplicou 9 µL de mistura contendo 5 µL de produtos amplificados para o alvo *hsp70* e 4 µL de tampão de amostra *Bluejuice 5x*. O gel de poliacrilamida foi submetido a uma eletroforese de 100 volts por 1 hora com tampão de corrida (TAE 1X) e posteriormente corado com nitrato de prata a 10%. Para isso 200 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético, água na proporção 40:10:50 v/v) foi diluído com 3 mL de nitrato de prata. O gel foi agitado na solução por cinco minutos, lavado em água corrente e aplicado 200 mL de solução reveladora e 3 mL de formaldeído. Em seguida foi feita uma nova agitação por cinco minutos até o aparecimento das bandas, e por fim analisado em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000.

Todas os procedimentos moleculares foram realizadas nos laboratórios de Entomologia e Genética da Fiocruz Rondônia.

4.8 Reação de sequenciamento

Para a identificação de *Leishmania* spp. a nível específico, os produtos amplificados pela reação PCR *hsp70* (fragmento esperado de 243 pb) foram submetidos ao processo de purificação e sequenciamento na empresa Genomic.

Os dados brutos foram editados com o programa (Pregap 4 e Gap 4 do pacote *Staden Package*) e as seqüências identificadas por BLASTn-*Basic Alignment Search*

Tool Program for Nucleotides (Altschul *et al.* 1990) no NCBI/*GenBank*. Posteriormente as sequências foram analisadas quanto a porcentagem de identidade, empregando-se o método de múltipla progressão de *Clustal W Multiple Alignment* (Thompson *et al.* 1994) por meio do programa MEGA4-*Molecular Evolucionary Genetics Analysis – Software Version 4* (Tamura *et al.* 2007). A análise de identificação foi realizada comparando-se os isolados deste estudo com uma sequência de referência para espécie depositada no *GenBank*.

4.9 Análise dos dados

Para comparar a riqueza e equitabilidade das espécies entre os ambientes foram construídas curvas de dominância utilizando a função *radfit* do pacote *Vegan* ajustada à distribuição de erros de Poisson. Essa função ajusta a matriz de dados a todos os modelos possíveis (i.e *Brokenstick*, *Pre-emption*, *Log-Normal*, *Zipf* e *Zipf-Mandelbrot*) e plota a curva utilizando o modelo que apresenta o melhor critério de informação de Akaike (AIC). Também foi aplicado um teste de ANOVA comparando a riqueza de espécies em cada área de acordo com o tipo de ecótopo amostrado (Peridomicílio ou floresta).

Para verificar a influência do ambiente, ecótopo e período da coleta sobre a composição de espécies de flebotomíneos foi aplicado uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), que consiste em uma análise não paramétrica multivariada baseada em permutações conforme descrita em Anderson (2001). Também foi utilizado o Valor de Indicação de Espécies (IndVal) para verificar a fidelidade e especificidade que as espécies apresentam com um determinado ambientes (Dufrene & Legendre 1997). Todas as análises foram realizadas no software estatístico R, a um nível de significância de 5% (R Development Core Team, 2010).

Para estimar a taxa de infecção nas amostras positivas para *Leishmania* spp., foi realizado o cálculo para a taxa de infecção mínima de acordo com Paiva *et al.* (2006) com a seguinte fórmula: Taxa mínima (TM) = N° de grupos positivos (*pools*) x 100/Total de flebotomíneos processados.

5 RESULTADOS

5.1 Composição da fauna flebotomínica

Foi coletado um total de 5.716 espécimes, 2.868 machos (50,19%) e 2.848 fêmeas (49,81%), e identificados em 46 espécies pertencentes a 11 gêneros: *Evandromyia* Mangabeira, *Lutzomyia* França, *Micropygomyia* Barretto, *Nyssomyia* Barretto, *Pintomyia* Costa Lima, *Psathyromyia* Barretto, *Psychodopygus* Mangabeira, *Sciopemyia* Barretto, *Trichophoromyia* Barretto, *Trichopygomyia* Barretto e *Viannamyia* Mangabeira. Não foi possível identificar alguns exemplares a nível específico devido perda de espermatecas durante a preparação das lâminas (*Psychodopygus* e *Evandromyia*), ou por espermatecas serem indistinguíveis (*Trichophoromyia* e *Trichopygomyia*), ficando apenas a nível genérico (Tabela 2).

Os gêneros com maior número de espécies foram *Psathyromyia* (oito), *Psychodopygus* (sete), *Evandromyia* (cinco) e *Trichophoromyia* (cinco). As espécies mais abundantes foram *Th. ubiquitalis* com 3.330 indivíduos (58,26%), *Ny. antunesi* com 661 indivíduos (11,26%) e *Ny. yuilli yuilli* com 261 indivíduos (4,57%). Outras espécies ocorreram em menor abundância correspondendo com menos de 4% do total identificado. Algumas espécies apresentaram apenas um indivíduo: *Ev. bourrouli*, *Mi. pilosa*, *Mi. rorotaensis*, *Th. auraensis*.

Das 46 espécies registradas, três são incriminadas como vetoras no Brasil: *Th. ubiquitalis* (3.330), *Ny. anduzei* (11), *Ny. umbratilis* (11). E outras cinco são

consideradas sospeitas: *Ny. antunesi* (661), *Ny. yuilli yuilli* (261), *Ps. davisii* (208), *Ps. amazonensis* (68), *Ps. hirsutus hirsutus* (56).

Tabela 2. Flebotomíneos coletados nos ambientes de terra firme e várzea no município de Tefé, Amazonas, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013.

Espécie	Terra Firme		Total	%	Várzea		Total	%	Total Geral	% Total
	♂	♀			♂	♀				
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	2084	1228	3312	57,94	12	6	18	0,31	3330	58,26
<i>Nyssomyia antunesi</i>	108	418	526	9,20	46	89	135	2,36	661	11,56
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	0	259	259	4,53	0	2	2	0,03	261	4,57
<i>Psychodopygus davisii</i>	129	78	207	3,62	1	0	1	0,02	208	3,64
<i>Th. sp.</i>	0	198	198	3,46	0	4	4	0,07	202	3,53
<i>Evandromyia walkeri</i>	36	38	74	1,29	13	74	87	1,52	161	2,82
<i>Th. melloi</i>	146	0	146	2,55	0	0	0	0,00	146	2,55
<i>Ps. amazonensis</i>	46	20	66	1,15	2	0	2	0,03	68	1,19
<i>Sciopemyia sordellii</i>	6	57	63	1,10	0	0	0	0,00	63	1,10
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	0	56	56	0,98	0	0	0	0,00	56	0,98
<i>Ps. ayrozai</i>	14	36	50	0,87	0	0	0	0,00	50	0,87
<i>Th. flochi</i>	45	0	45	0,79	0	0	0	0,00	45	0,79
<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	37	4	41	0,72	0	1	1	0,02	42	0,73
<i>Ps. claustris</i>	11	25	36	0,63	0	0	0	0,00	36	0,63
<i>Viannomyia tuberculata</i>	0	34	34	0,59	0	2	2	0,03	36	0,63
<i>Lutzomyia marinkellei</i>	0	35	35	0,61	0	0	0	0,00	35	0,61
<i>Pa. scaffii</i>	11	18	29	0,51	5	1	6	0,10	35	0,61
<i>Lu. falcata</i>	0	32	32	0,56	0	0	0	0,00	32	0,56
<i>Sc. preclara</i>	14	12	26	0,45	0	1	1	0,02	27	0,47
<i>Ev. begoniae</i>	0	26	26	0,45	0	0	0	0,00	26	0,45
<i>Pa. aragaoi</i>	12	7	19	0,33	0	1	1	0,02	20	0,35
<i>Trichopygomyia rondoniensis</i>	18	0	18	0,31	0	0	0	0,00	18	0,31
<i>Ps. sp.</i>	0	16	16	0,28	0	2	2	0,03	18	0,31
<i>Ev. tarapacaensis</i>	3	10	13	0,23	0	0	0	0,00	13	0,23
<i>Pa. souzacaastroi</i>	7	0	7	0,12	5	0	5	0,09	12	0,21

Continua...

Espécie	Terra Firme		Total	%	Várzea		Total	%	Total Geral	% Total
	♂	♀			♂	♀				
<i>Ny. anduzei</i>	7	2	9	0,16	1	1	2	0,03	11	0,19
<i>Ny. umbratilis</i>	6	5	11	0,19	0	0	0	0,00	11	0,19
<i>Ty. sp.</i>	0	10	10	0,17	0	1	1	0,02	11	0,19
<i>Pa. runoides</i>	1	9	10	0,17	0	0	0	0,00	10	0,17
<i>Pa. shannoni</i>	7	1	8	0,14	2	0	2	0,03	10	0,17
<i>Pintomyia serrana</i>	1	1	2	0,03	4	2	6	0,10	8	0,14
<i>Vi. furcata</i>	8	0	8	0,14	0	0	0	0,00	8	0,14
<i>Lu. sherlocki</i>	0	5	5	0,09	0	0	0	0,00	5	0,09
<i>Vi. caprina</i>	1	3	4	0,07	0	1	1	0,02	5	0,09
<i>Micropygomyia chassignetti</i>	4	0	4	0,07	0	0	0	0,00	4	0,07
<i>Ty. wagleyi</i>	4	0	4	0,07	0	0	0	0,00	4	0,07
<i>Mi. micropyga</i>	0	0	0	0,00	1	2	3	0,05	3	0,05
<i>Pa. campbelli</i>	1	0	1	0,02	0	2	2	0,03	3	0,05
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	3	0	3	0,05	0	0	0	0,00	3	0,05
<i>Pa. lutziana</i>	0	3	3	0,05	0	0	0	0,00	3	0,05
<i>Pa. sp.</i>	0	3	3	0,05	0	0	0	0,00	3	0,05
<i>Ev. saulensis</i>	0	1	1	0,02	0	1	1	0,02	2	0,03
<i>Ps. paraensis</i>	0	2	2	0,03	0	0	0	0,00	2	0,03
<i>Ty. dunhami</i>	1	0	1	0,02	1	0	1	0,02	2	0,03
<i>Ev. bourrouli</i>	0	0	0	0,00	1	0	1	0,02	1	0,02
<i>Ev. sp.</i>	0	1	1	0,02	0	0	0	0,00	1	0,02
<i>Lu. sp.</i>	0	1	1	0,02	0	0	0	0,00	1	0,02
<i>Mi. pilosa</i>	0	1	1	0,02	0	0	0	0,00	1	0,02
<i>Mi. rorotaensis</i>	1	0	1	0,02	0	0	0	0,00	1	0,02
<i>Th. auraensis</i>	0	0	0	0,00	1	0	1	0,02	1	0,02
<i>Ty. longispina</i>	1	0	1	0,02	0	0	0	0,00	1	0,02
Total	2773	2655	5428	94,96	95	193	288	5,04	5716	100

Quanto aos ambientes, foi observado na terra firme uma maior riqueza e abundância de flebotomíneos em relação ao ambiente de várzea. A figura 7 mostra a curva de abundância de espécies baseada no critério AIC indicando que o método *Zipf* foi o melhor para representar a abundância e equitabilidade das espécies do ambiente terra firme. Foi encontrado na terra firme um total de 42 espécies em 5.428 indivíduos, sendo as espécies mais abundantes *Th. ubiquitalis* com 3.312 indivíduos, seguida por *Ny. antunesi* e *Ny. yuilli yuilli* com 526 e 259 indivíduos respectivamente. No ambiente de várzea o método *Zipf-Mandelbrot* foi o que melhor representou a abundância e equitabilidade; nesse ambiente foram encontradas 23 espécies e 288 indivíduos e as espécies mais abundantes foram *Ny. antunesi* com 135 indivíduos, seguida por *Ev. walkeri* e *Th. ubiquitalis* com 87 e 18 indivíduos respectivamente.

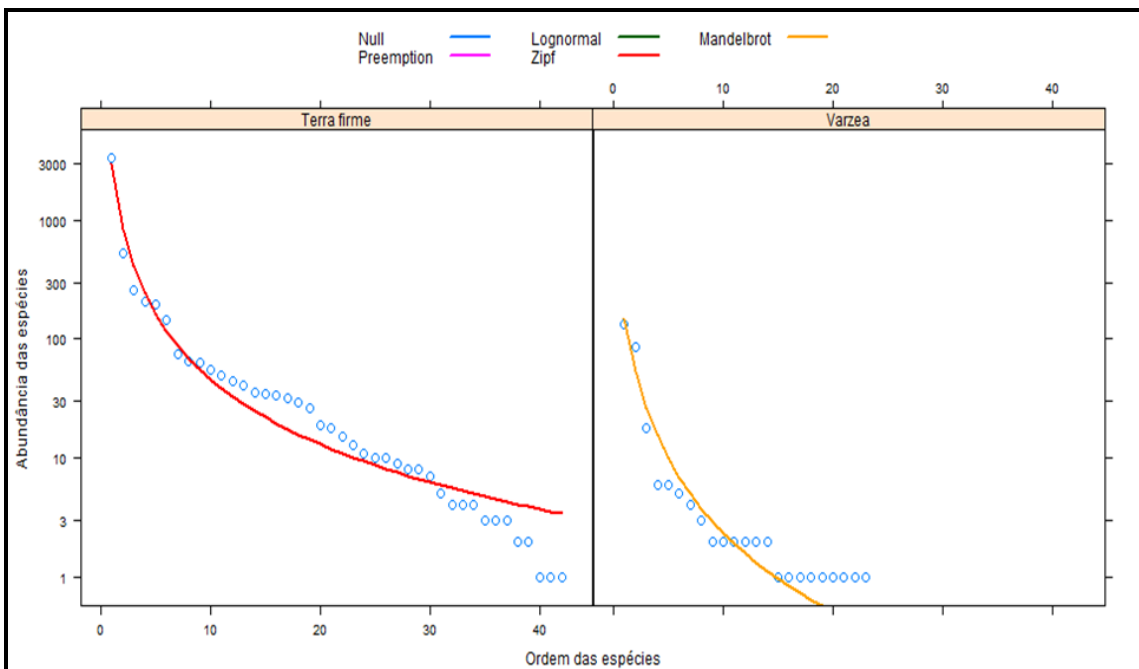


Figura 7. Curva de abundância de flebotomíneos em ambiente de terra firme e de várzea, coletados nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, no município de Tefé, Amazonas.

Do total de espécies coletadas a análise de IndVal identificou cinco espécies com potenciais valores de bioindicação, sendo *Th. ubiquitous* a espécie que apresentou maior fidelidade e especificidade com o ambiente de terra firme apresentando um valor de indicação superior a 90%. Já para a várzea apenas *Ev. walkeri* foi identificada como potencial bioindicador, embora seu valor de indicação calculado tenha ficado abaixo de 40% (Tabela 3).

Tabela 3. Valor individual de indicação (IndVal) de flebotomíneos nos ambientes de terra firme e várzea nos meses de Janeiro, Fevereiro, Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, no município de Tefé, Amazonas.

Espécie	Ambiente	IndVal(%)	P	Frequência
<i>Th. ubiquitous</i>	Terra Firme	90,33	0,001	82
<i>Ps. davis</i>	Terra Firme	48,97	0,001	40
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	Terra Firme	48,74	0,001	40
<i>Th. melloi</i>	Terra Firme	44,30	0,001	35
<i>Ev. walkeri</i>	Várzea	35,71	0,01	53

A comparação das riquezas entre os ambientes e entre os ecótopos mostrou que o ambiente de terra firme foi o mais rico em relação ao ambiente de várzea (ANOVA $\chi^2 = 11,43$, $p < 0,001$). Quando as análises foram realizadas considerando os ecótopos, independente do ambiente, as florestas também apresentaram uma maior riqueza de espécies em relação aos peridomicílios (ANOVA $\chi^2 = 3,95$, $p < 0,04$) (Figura 8).

A PERMANOVA mostrou que ocorreu diferença significativa na composição das espécies de flebotomíneos entre os ambientes de terra firme e várzea (PERMANOVA pseudo-F=24,72, $p < 0,001$), fato que também ocorreu quando considerado os ecótopos (floresta e peridomicílio) e a interação entre esses dois fatores

(Ambiente e ecótopo), embora a média de quadrados tenha indicado que o ambiente é o fator mais importante na definição de composição de espécies (Tabela 4).

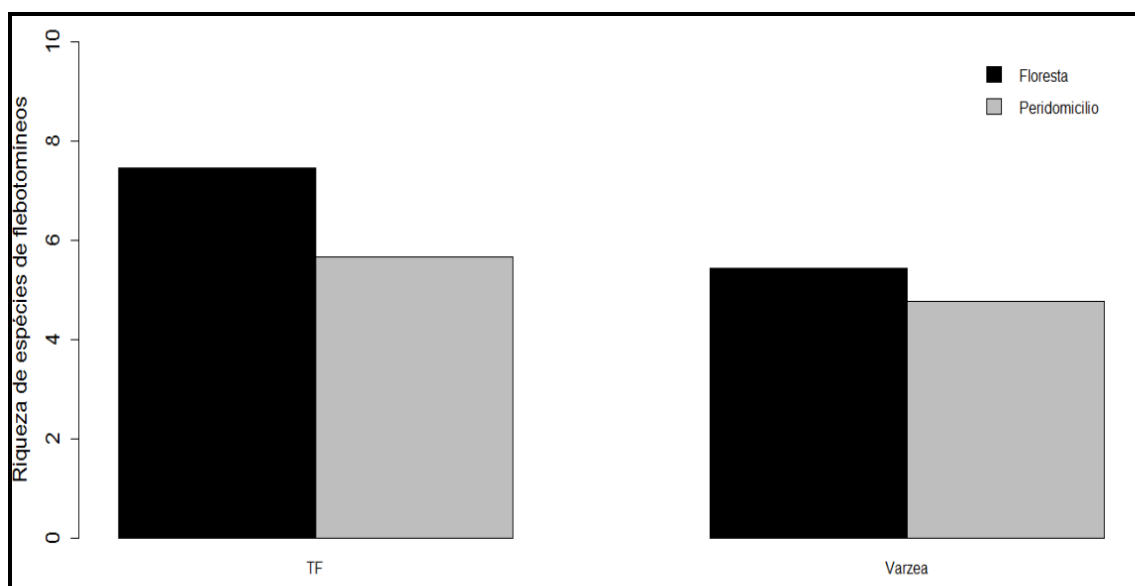


Figura 8. Riqueza de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio dos ambientes de terra firme (TF) e várzea, no município de Tefé, Amazonas.

Tabela 4. Riqueza de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio dos ambientes de terra firme (TF) e várzea, no município de Tefé, Amazonas.

Fonte	g.l.	SQ	MQ	F	P
Ambiente	1	6,80	6,80	24,72	0.0002
Ecótopo	1	1,90	1,90	6,90	0.0002
Período	5	1,68	0,33	1,22	0.1630
Ambiente*Ecótopo	1	1,21	1,21	4,42	0.0002
Ambiente*Período	5	1,48	0,29	1,07	0.3570
Ecótopo*Período	5	2,08	0,41	1,51	0.0238
Ambiente*Ecótopo*Período	4	1,23	0,30	1,12	0.2712
Residuais	104	28,61	0,27		
Total	126	45,02			

Grau de Liberdade (g.l.), Soma dos quadrados (SQ), Média dos quadrados (MQ), Valor de teste (F), valores em negrito indicam diferença significativa.

No geral a abundância e o número de espécies foi maior do ecótopo de floresta com 43 espécies em 4.952 indivíduos (86,64%) em relação ao peridomicílio com 28 espécies em 764 indivíduos (13,36%). Em relação aos ecótopos nos diferentes ambientes foram observados os seguintes resultados: na terra firme no ecótopo de floresta foi capturado maior número de indivíduos e de espécies (4.689 indivíduos – 82,03%, 39 espécies) em relação ao peridomicílio (739 indivíduos - 12,93%, 27 espécies). As espécies mais abundantes na floresta foram *Th. ubiquitalis*, *Ny. yuilli yuilli* e *Ny. antunesi* com 2.984, 249, 248 indivíduos respectivamente e no peridomicílio as mais abundantes foram *Th. ubiquitalis* (328 indivíduos), *Ny. antunesi* (278 indivíduos) e *Ev. walkeri* (38 indivíduos). O número de machos foi maior que o de fêmeas no ecótopo de floresta (2.282 fêmeas e 2.407 machos), enquanto no peridomicílio ocorreu o contrário (373 fêmeas e 366 machos) (Tabela 5). No ambiente de várzea (Tabela 6), o ecótopo de floresta também foi encontrado um maior número de flebotomíneos e de espécies (263 indivíduos – 4,60%, 21 espécies) em relação ao peridomicílio (25 indivíduos – 0,44%, 4 espécies). *Ny. antunesi*, *Ev. walkeri* e *Th. ubiquitalis* foram as espécies mais abundantes em ambos ecótopos. O número de fêmeas nos dois ecótopos também foi maior que o de machos tanto na floresta (176 fêmeas e 87 machos), quanto no peridomicílio (17 fêmeas 8 machos) (Tabela 6).

Tabela 5. Abundância de flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio no ambiente de terra firme, município de Tefé, Amazonas.

Espécie	Floresta		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	1827	1157	257	71	3312	61,02
<i>Nyssomyia antunesi</i>	62	186	46	232	526	9,69
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	0	249	0	10	259	4,77
<i>Psychodopygus davisi</i>	127	76	2	2	207	3,81
<i>Th. sp.</i>	0	183	0	15	198	3,65
<i>Th. melloi</i>	123	0	23	0	146	2,69
<i>Evandromyia walkeri</i>	9	27	27	11	74	1,36
<i>Ps. amazonensis</i>	45	20	1	0	66	1,22
<i>Sciopemyia sordellii</i>	5	48	1	9	63	1,16
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	0	55	0	1	56	1,03
<i>Ps. ayrozai</i>	14	33	0	3	50	0,92
<i>Th. flochi</i>	44	0	1	0	45	0,83
<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	36	4	1	0	41	0,76
<i>Ps. clausi</i>	10	25	1	0	36	0,66
<i>Lutzomyia marinkellei</i>	0	33	0	2	35	0,64
<i>Viannamyia tuberculata</i>	0	34	0	0	34	0,63
<i>Lu. falcata</i>	0	31	0	1	32	0,59
<i>Pa. scaffii</i>	9	16	2	2	29	0,53
<i>Sc. preclara</i>	14	12	0	0	26	0,48
<i>Ev. begoniae</i>	0	24	0	2	26	0,48
<i>Pa. aragaoi</i>	12	7	0	0	19	0,35
<i>Trichopygomyia rondonienses</i>	18	0	0	0	18	0,33
<i>Ps. sp.</i>	0	16	0	0	16	0,29
<i>Ev. tarapacaensis</i>	2	4	1	6	13	0,24
<i>Ny. umbratilis</i>	6	5	0	0	11	0,20
<i>Ty. sp.</i>	0	9	0	1	10	0,18

Continua...

Espécie	Floresta		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>Pa. runoides</i>	0	7	1	2	10	0,18
<i>Ny. anduzei</i>	7	1	0	1	9	0,17
<i>Pa. shannoni</i>	7	1	0	0	8	0,15
<i>Vi. furcata</i>	7	0	1	0	8	0,15
<i>Pa. souzacaastroi</i>	6	0	1	0	7	0,13
<i>Lu. sherlocki</i>	0	5	0	0	5	0,09
<i>Vi. caprina</i>	1	3	0	0	4	0,07
<i>Micropygomyia chassignetti</i>	4	0	0	0	4	0,07
<i>Ty. wagleyi</i>	4	0	0	0	4	0,07
<i>Pintomyia serrana</i>	1	0	0	1	2	0,04
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	3	0	0	0	3	0,06
<i>Pa. lutziana</i>	0	2	0	1	3	0,06
<i>Pa. sp.</i>	0	3	0	0	3	0,06
<i>Ps. paraensis</i>	0	2	0	0	2	0,04
<i>Pa. campbelli</i>	1	0	0	0	1	0,02
<i>Ev. saulensis</i>	0	1	0	0	1	0,02
<i>Ty. dunhami</i>	1	0	0	0	1	0,02
<i>Ev. sp.</i>	0	1	0	0	1	0,02
<i>Lu. sp.</i>	0	1	0	0	1	0,02
<i>Mi. pilosa</i>	0	1	0	0	1	0,02
<i>Mi. rorotaensis</i>	1	0	0	0	1	0,02
<i>Ty. longispina</i>	1	0	0	0	1	0,02
Total	2407	2282	366	373	5428	100

Tabela 6. Abundância dos Flebotomíneos nos ecótopos de floresta e peridomicílio no ambiente de Várzea, município de Tefé, Amazonas.

Espécie	Floresta		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>Nyssomyia antunesi</i>	43	79	3	10	135	46,88
<i>Evandromyia walkeri</i>	11	67	2	7	87	30,21
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	9	6	3	0	18	6,25
<i>Psathyromyia scaffi</i>	5	1	0	0	6	2,08
<i>Pintomyia serrana</i>	4	2	0	0	6	2,08
<i>Pa. souzacaastroi</i>	5	0	0	0	5	1,74
<i>Th. sp.</i>	0	4	0	0	4	1,39
<i>Micropygomyia micropyga</i>	1	2	0	0	3	1,04
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	0	2	0	0	2	0,69
<i>Psychodopygus amazonensis</i>	2	0	0	0	2	0,69
<i>Viannamyia tuberculata</i>	0	2	0	0	2	0,69
<i>Ps. sp.</i>	0	2	0	0	2	0,69
<i>Ny. anduzei</i>	1	1	0	0	2	0,69
<i>Pa. shannoni</i>	2	0	0	0	2	0,69
<i>Pa. campbelli</i>	0	2	0	0	2	0,69
<i>Ps. davisii</i>	1	0	0	0	1	0,35
<i>Pa. dendrophyla</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Sciopemyia preclara</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Pa. aragaoi</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Ty. sp.</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Vi. caprina</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Ev. saulensis</i>	0	1	0	0	1	0,35
<i>Ty. dunhami</i>	1	0	0	0	1	0,35
<i>Ev. bourrouli</i>	1	0	0	0	1	0,35
<i>Th. auraensis</i>	1	0	0	0	1	0,35
Total	87	176	8	17	288	100

Na figura 9 é representada a abundância de flebotomíneos durante os meses de coletas. Na terra firme a abundância de flebotomíneos foi relativamente igual, sendo o mês de Abril que apresentou maior abundância (1.191 indivíduos) e Outubro de menor abundância (476 indivíduos). Na várzea foi registrado maior número de flebotomíneos capturados no mês de Fevereiro (90 indivíduos) e o menor em Abril (11 indivíduos).

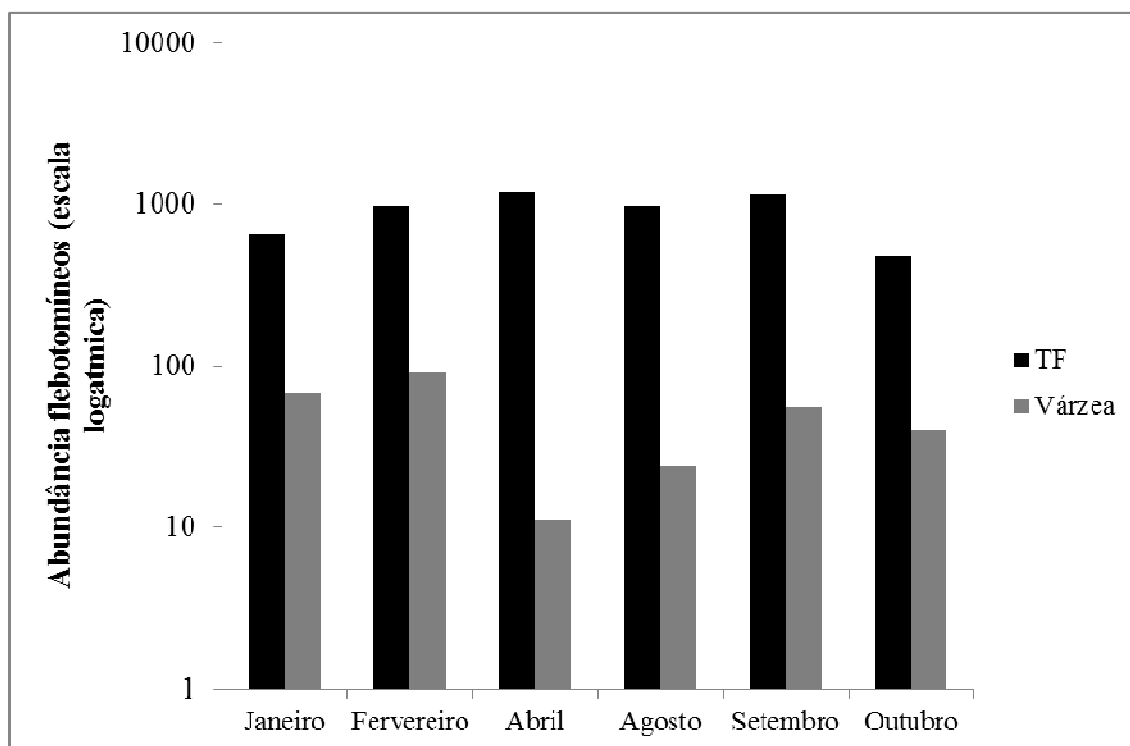


Figura 9. Abundância de flebotomíneos nos meses de Janeiro, Fevereiro e Abril, Agosto, Setembro e Outubro de 2013, município de Tefé, Amazonas.

5.2 Infecção Natural de Flebotomíneos por *Leishmania* spp.

Um total de 1.679 fêmeas (29,37%) foi agrupado em 95 pools. Deste total, 92 pools pertenceram ao ambiente de terra firme e três ao ambiente de várzea (Tabela 7). Na terra firme 78 pools foram provenientes do ecótopo de floresta e 12 pertenciam ao peridomicílio. Na várzea todos os *pools* foram provenientes do ecótopo de floresta. O maior número de *pools* (60) foram da espécie *Th. ubiquitalis*, e os demais corresponderam a *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Ny. yuilli yuilli*, *Ps. ayrozai* e *Ps. davisi*.

Tabela 7. Número de pools com suas respectivas espécies, separadas por ambiente e ecótopos, no município de Tefé, Amazonas.

Espécies	Terra firme			Várzea		Total	%
	F	P	F + P	F	P		
<i>Th. ubiquitous</i>	57	3	-	-	-	60	63,2
<i>Ny. antunesi</i>	6	9	-	3	-	18	18,9
<i>Ny. yuilli yuilli</i>	8	-	-	-	-	8	8,4
<i>Ps. davis</i>	4	-	-	-	-	4	4,2
<i>Ps. ayrozai</i>	2	-	2	-	-	4	4,2
<i>Ny. umbratilis</i>	1	-	-	-	-	1	1,1
Total	78	12	2	3	-	95	100

Floresta (F), Peridomicílio (P), Floresta com Peridomicílio (F+P).

Ao utilizar os *primers* para a região do kDNA (120 pb), 14/95 pools de flebotomíneos testados foram positivos para a presença de *Leishmania* spp., sendo 10 pools correspondendo à espécie *Th. ubiquitous* e 4 pools à *Ps. davis* (Figura 10). A taxa mínima de infecção (TM) foi de 0,83% (14/1.679 fêmeas analisadas). Considerando individualmente cada espécie, foi observado para *Th. ubiquitous* uma TM de 0,87% (10/1.138 fêmeas analisadas) e para *Ps. davis* uma TM de 6,25% (4/64 fêmeas analisadas).

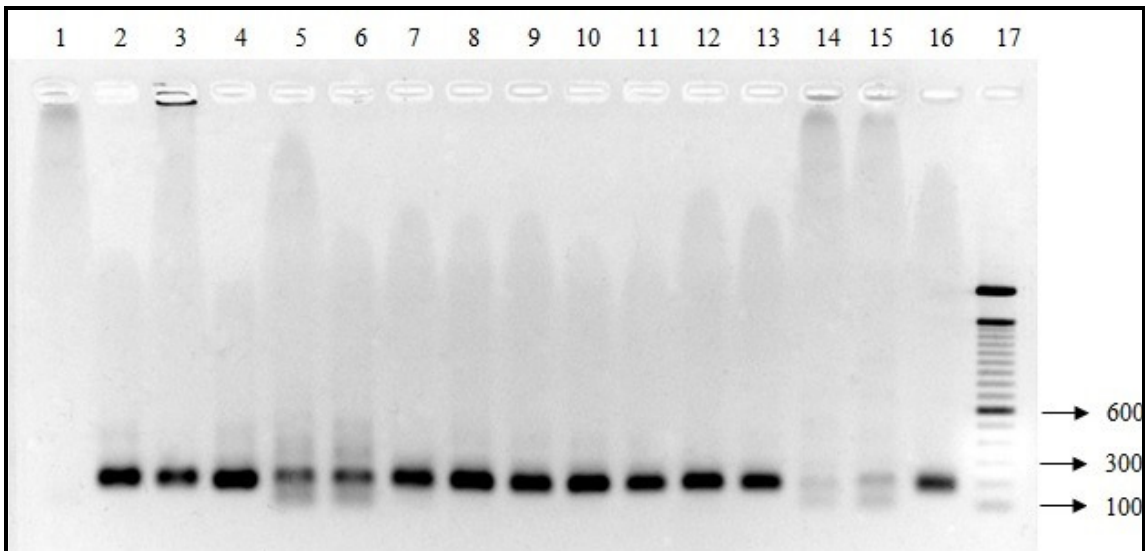


Figura 10. Gel de agarose 2% corado com GelRed, mostrando produtos amplificados pela PCR kDNA com amostras de DNA extraídas de fêmeas de flebotomíneos (Tefé, AM) Canaletas: 1: controle negativo (Água ultrapura - H₂O Milli-Q); 2 a 4: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 5 a 6: *Psychodopygus davisi*; 7 a 13: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 14 15: *Psychodopygus davisi*; 16: controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 17: peso molecular de 100pb (Invitrogen).

Na PCR dirigida para o alvo hsp70 dos 14 pools positivos para a região do kDNA, sete amostras amplificaram. Todos os pools positivos foram da espécie *Th. ubiquitalis* (Figura 11).

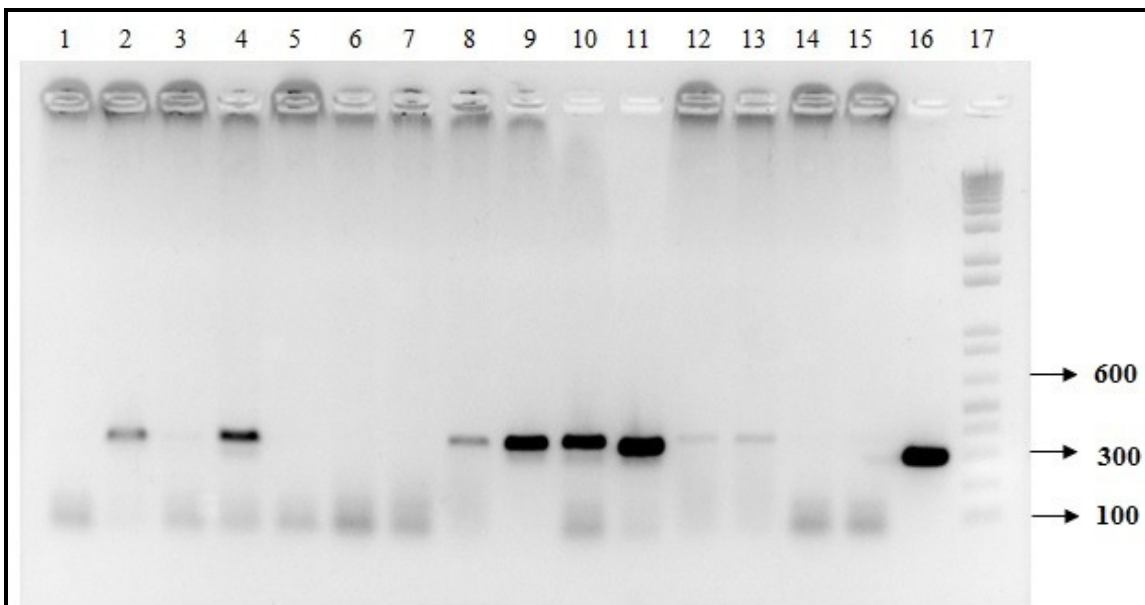


Figura 11. Gel de agarose 2% corado com GelRed, mostrando produtos amplificados pela hsp70 com amostras de DNA extraídas de fêmeas de flebotomíneos (Tefé, AM) Canaletas: 1: controle negativo (água ultrapura Milli-Q); 2 a 4: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 5 a 6: *Psychodopygus davisi*; 7 a 13: *Trichophoromyia ubiquitalis*; 14 e 15: *Psychodopygus davisi*; 16: controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, 17: peso molecular de 100pb (Invitrogen).

Ao aplicar as amostras na digestão por enzimas, como ilustrado na Figura 12, foi observado que todas as amostras de *Th. ubiquitalis* digeridas pela enzima *HaeIII* alinharam no fragmento para as espécies *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawi*. E quando digeridas pela enzima *BstUI* duas amostras foram mais evidentes (canaleta 15 e 17) e seguiram o padrão para o fragmento da espécie *L. (V.) naiffi*. As outras amostras não apresentaram nenhum padrão.

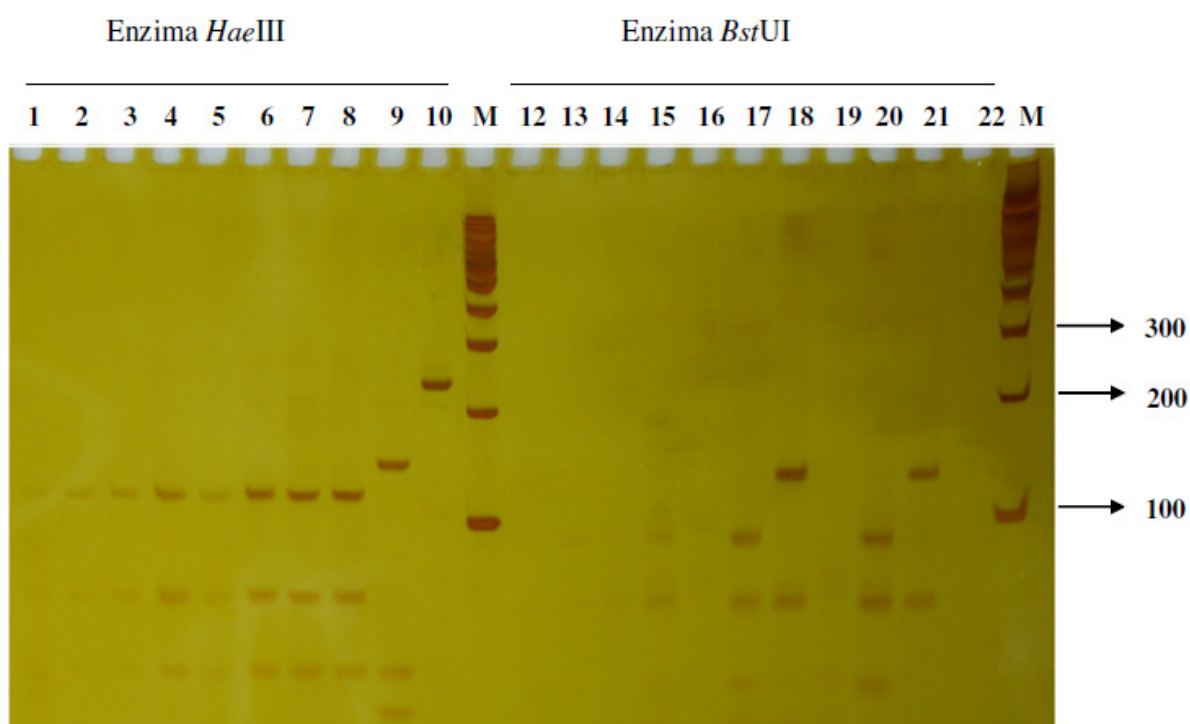


Figura 12. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata, mostrando os perfis de restrição obtidos pela técnica de PCR-RFLP utilizando as enzimas *HaeIII* e *BstUI* nas amostras de fêmeas de *Thichophoromyia ubiquitalis* capturadas no ambiente de terra firme, e cótopo floresta, no município de Tefé, Amazonas. Canaletas: 1 e 12 = pool 65; 2 e 13 = pool 4; 3 e 14 = pool 24; 4 e 15 = pool 70; 5 e 16 = pool 72; 6 e 17 = pool 77; 7 e 18 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) lainsoni*; 8 e 19 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) shawi*; 9 e 20 = controle positivo de *Leishmania (Viannia) naiffi*; 10 e 21 = controle positivo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 22 = controle negativo (Água ultrapura - H₂O Milli-Q); M = Peso molecular 100 pb (Invitrogen).

O sequenciamento confirmou a espécie *L. (V.) lainsoni* obtido inicialmente na (RFL-PCR). A similaridade das sequências entre as amostras positivas para o hsp70

(pool 70_hsp70 e pool 72_hsp70) com as amostras depositadas no *GenBank* foi de 99% e menos de 1% de divergência (Figura 13).

```

gi|289066226|gb|GU071176.1|      GTACGAGCAGGCCGACAAGATGCAGCGCAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGCTCTGGAGAA
pool170_hsp70                    -----GCAGCGCGAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGCTCTGGAGAA
pool172_hsp70                    -----GGCCGACAGANGCAGCGCGAGCGCGTGGAGGCGAAGAACGCTCTGGAGAA
                                  *****

gi|289066226|gb|GU071176.1|      CTACGCGTACTCGATGAAGAACACGACCTCCGACTCGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGA
pool170_hsp70                    CTACGCGTACTCGATGAAGAACACGANCTCCGACTCGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGA
pool172_hsp70                    CTACGCGTACTCGATGAAGAACACGACCTCCGACTCGAACGTGTCCGGCAAGCTGGAGGA
                                  *****

gi|289066226|gb|GU071176.1|      GAGCGACAAGGCCACGCTGAACTCGGCGATCGACCGGCGCTGGAGTGGCTGAACAACAA
pool170_hsp70                    GAGCGACAAGGCCNCGCTGAACTCGGCGATCGACCGGCGCTGGAGTGGCTGAACAACAA
pool172_hsp70                    GAGCGACAAGGCCACGCTGAACTCGGCGATCGACCGGCGCTGGAGTGGCTGAACAACAA
                                  *****

gi|289066226|gb|GU071176.1|      CCAGGAGGCGTCGAAGGAAGAGTACGAG
pool170_hsp70                    CCAGGAGGCGTCGAAGGA-----
pool172_hsp70                    CCAGGAGGCGTCGAAGGA-----
                                  *****

```

Figura 13. Sequências obtidas no sequenciamento das amostras pool170_hsp70 e pool172_hsp70 alinhadas com a sequência de referência para espécie *Leishmania (Viannia) lainsoni* depositada no GenBank (GU071176.1).

6 DISCUSSÃO

A fauna de flebotomíneos do estado do Amazonas corresponde a aproximadamente 50% das espécies registradas no Brasil. No município de Tefé encontramos 46 espécies, esse total corresponde a 34,5% da fauna do Amazonas, indicando uma fauna rica e diversificada, principalmente quando comparado com trabalhos em outras regiões do estado: Dias-Lima *et al.* (2002) e Silva e Castellón (2010) que encontraram 38 e 48 espécies no município de Manaus. Fé *et al.* (1998) coletaram 35 espécies no município de São Gabriel da Cachoeira. Silva *et al.* (2007) capturaram 43 espécies no município de Manacapuru. E no médio Solimões Barrett *et al.* (1996) registraram 52 espécies no município de Tefé e Castellón *et al.* (2000) encontraram 50 espécies no município de Coari.

A quantidade de machos nesse trabalho foi ligeiramente maior que a de fêmeas. Diferentemente de outros trabalhos que encontraram uma diferença expressiva entre o número de machos e fêmeas coletados, como Pessoa *et al.* (2007) que obtiveram a proporção de machos superior a de fêmeas no município de Itacoatiara, Amazonas. Oliveira *et al.* (2007) no município de Três Lagoas, no Mato Grosso do Sul, também registraram uma maior quantidade de machos em comparação às fêmeas. Provavelmente, isso ocorra pelo fato dos machos emergirem antes das fêmeas, e também pelo comportamento dos flebotomíneos formarem agregados visando garantir a cópula com as fêmeas, atraindo assim uma grande quantidade de machos e estes sendo capturados com mais facilidade pelas armadilhas (Dye *et al.* 1991; Galati *et al.* 1997).

As curvas de abundância de espécies vem sendo uma ferramenta utilizada com o intuito de explicar padrões de abundância e equitabilidade (Verberk *et al.* 2010, Verberk 2012). Na curva de abundância a quantidade de espécies no ambiente de terra firme (43)

foi superior ao ambiente de várzea (23). Rebêlo e Oliveira-Pereira (2001) obtiveram o mesmo padrão na distribuição dos flebotomíneos no município de Paragominas, estado do Pará, sendo que o ambiente de terra firme representou 79% da fauna coletada e o ambiente de várzea com 21%. Padrão similar foi observado para a fauna de culicídeos no estado do Amazonas nos ambientes de terra firme e várzea (Hutchings *et al.* 2002; Hutchings *et al.* 2004). Trindade e Gorayeb (2010) encontraram uma fauna diversificada ceratopogonídeos do gênero *Culicoides* em ambientes de várzea na Amazônia oriental.

Apesar da riqueza ter sido alta em ambos ambientes a equitabilidade foi baixa, visto que poucas espécies foram dominantes. No ambiente de terra firme foi observado que a abundância (Figura 7) apresentou uma grande inclinação no início da curva devido à dominância de *Th. ubiquitalis*, *Ny. antunesi* e *Ny. yuilli yuilli*, e no ambiente de várzea pela dominância de *Ny. antunesi* e *Ev. walkeri*. Outros trabalhos demonstraram este perfil em que a fauna de flebotomíneos é composta por poucas espécies dominantes e um grande número de espécies com poucos indivíduos. Na região do rio Solimões Silva *et al.* (2007) encontraram 43 espécies, onde 64% dos flebotomíneos capturados pertenceram às espécies *Ny. anduzei*, *Ps. davisii*, *Ny. umbratilis* e *Ty. longispina*; Barrett *et al.* (1996) encontraram 50% da abundância entre as três primeiras espécies *Th. ubiquitalis*, *Ny. richardwardi*, *Ny. yuilli* e Castellón *et al.* (2000) coletaram 54% dos flebotomíneos das espécies *Ps. chagasi*, *P. davisii* e *Ps. ayrozai* e *Th. ubiquitalis*. No município de Manaus, Cabanillas e Castellón (1999) observaram que 85% da fauna corresponderam a *Ny. umbratilis*. Dias-Lima *et al.* (2002) obtiveram 55% da fauna representados por *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Ps. davisii* e *Mi. rorotaensis*. Pessoa *et al.* (2007) coletaram aproximadamente 80% da fauna composta

por *Ny. umbratilis*. Silva *et al.* (2010) capturaram em ambiente de floresta de Campinarana, Manaus, Amazonas, 814 flebotomíneos em 26 espécies e verificaram que *Bi. flaviscutellata*, *Ev. georgii* e *Bi. olmeca nociva* somaram 85% da fauna; Rocha *et al.* (2013) assinalaram 41 espécies distribuídas em mais de 4 mil indivíduos, e 70% da fauna corresponderam às espécies *Ny. umbratilis*, *anduzei*, *Ps. claustrai* e *Mi. rorotanesis*.

Nesse estudo *Th. ubiquitous* foi a espécie mais abundante corroborando com Barrett *et al.* (1996) na mesma região, e com o estudo realizado por Castellón *et al.* (2000) nas florestas do gasoduto de Coari, onde registraram essa espécie como uma das mais representativas no médio Solimões. Resultados semelhantes também foram observados em outras regiões do Amazonas por Alves *et al.* (2012) que assinalaram *Th. ubiquitous* como a principal espécie em coletas feitas nos municípios de Borba e Maués. Diferentemente, em Manaus e alguns municípios vizinhos, *Ny. umbratilis* vem sendo apontada como espécie mais abundante (Arias e Freitas 1982; Dias Lima *et al.* 2002; Feitosa e Castellón 2004; Silva *et al.* 2007).

A espécie *Ny. antunesi* foi a segunda mais abundante no ambiente de terra firme e a mais abundante no ambiente de várzea. Ramos (2012) no município de Presidente Figueiredo, Amazonas e Figueira *et al.* (2013) no município de Lábrea, Amazonas, demonstraram que esta espécie tem uma afinidade por ambientes antropizados. *Ny. antunesi* já foi encontrada infectada por *L. (V.) lindenbergi* (Silveira *et al.* 2002) e algumas espécies do gênero *Nyssomyia* ocorrem em grande abundância em locais antropizados (Teodoro *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2008; Silva e Castellón 2010). O relato de flebotomíneos em tais áreas alerta para o risco de possíveis infecções no homem em ambiente peridomiciliar, citando como exemplo *Ny. withmani* e *Ny.*

intermedia na regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país (Queiroz *et al.* 1991; Queiroz *et al.* 1994; Legriffon *et al.* 2012).

A segunda espécie mais abundante no ambiente de várzea foi *Ev. walkeri*. Esta espécie também foi uma das mais abundantes registrada por Figueira *et al.* (2013) no ambiente de peridomicílio no município de Lábrea, e a principal espécie encontrada por Pinheiro *et al.* (2013) em ambiente agroflorestral no município de Parnamirim, Rio Grande do Norte, indicando a capacidade de adaptação dessa espécie às variações antrópicas no ambiente. O índice de valorização das espécies (IndVal) encontrado nesse trabalho mostra que essa espécie se adapta em ambiente impactado.

Os ecótopos de floresta e peridomicílio apresentaram variações tanto na riqueza como na abundância de flebotomíneos. No ecótopo de floresta foram capturadas 43 espécies enquanto no peridomicílio 28. Ramos (2012), no município de Presidente Figueiredo, encontraram 44 espécies na floresta e 32 no peridomicílio. Barbosa *et al.* (2008) em bairros periféricos de Manaus, coletaram 38 espécies na floresta e 11 no peridomicílio. Algumas espécies de flebotomíneos coletados nesse estudo possuem comportamento indicando fortes indícios de sinantropização. As espécies *Th. ubiquitalis* e *Ny. antunesi* ocorreram em grande abundância tanto em floresta como em peridomicílio; *Ev. walkeri* foi coletada em maior abundância no peridomicílio, em contrapartida *Ny. yuilli yuilli* foi abundante somente no ecótopo floresta.

A abundância de flebotomíneos no ambiente de terra firme foi constante durante os meses amostrados, com exceção do mês de Outubro. Os meses iniciais de coletas (Janeiro e Fevereiro e Abril) apresentaram grande regime de chuvas, essa observação corrobora com outros trabalhos na região amazônica em que populações de flebotomíneos aumentam principalmente na época chuvosa (Rebêlo e Oliveira-Pereira;

Dias-Lima *et al.* 2002; Barbosa 2008). A abundância de flebótomos no ambiente de várzea também demonstrou esse padrão nos meses de Janeiro e Fevereiro, e diminuiu no mês de Abril, tal fato se deve à quantidade de chuvas aliada com a cheia do rio Solimões, que atingiu esse ambiente no referido mês, o que tornou a várzea desfavorável para os flebotomíneos (Shaw e Lainson 1972). Nos meses posteriores em que houve a vazante a quantidade de flebotomíneos aumentou novamente, isso reforça que os flebotomíneos adquirem alguma estratégia para restabelecer após a época da vazante nos rios (Rêbello e Oliveira-Pereira 2001).

Em relação à infecção de flebotomíneos por *Leishmania*, obteve-se uma TM de 0,83% em 1.679 fêmeas analisadas. Outros estudos tem mostrado elevados valores para taxa de infecção: Michalsky *et al.* (2011) detectaram a presença de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais, encontrando taxa mínima de 3,9%. Mesmo valor foi encontrado por Paiva *et al.* (2006) em *Lu. longipalpis* infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) amazonensis* no município de Antonio João, Mato Grosso do Sul. Silva *et al.* (2008) no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, encontraram *Lu. longipalpis* infectada com *Leishmania* spp. e taxa de infecção de 1,9%. O valor da TM na presente dissertação foi similar aos de Oliveira Pereira *et al.* (2006) que verificaram a presença de DNA de *Leishmania* sp. em *Ny. whitmani* com taxa mínima de 0,80% em Buriticupu, Maranhão. Oliveira *et al.* (2011) encontraram *Ny. neivai* com presença de DNA *Leishmania (Viannia)* spp. e taxa de infecção natural de 0,23%, em Doutor Camargo, Paraná.

Até o presente momento as espécies de flebotomíneos infectadas por *Leishmania* no estado do Amazonas eram *Bi. flaviscutellata*, *Bi. olmeca nociva* (Arias e Naiff 1987)

e *Ny. umbratilis* (Arias e Freitas 1982). A partir desse trabalho é acrescentado o registro de infecção natural em *Th. ubiquitalis* e *Ps. davisi* no estado do Amazonas. A espécie *Th. ubiquitalis* já foi comprovada como vetora no estado do Pará (Silveira *et al.* 1987; Lainson *et al.* 1992). Apesar da baixa antropofilia dessa espécie pode ocasionalmente picar o homem (Lainson *et al.* 1992). Já *Ps. davisi* foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* no estado de Rondônia (Grimaldi *et al.* 1991; Gil *et al.* 2003).

As espécies de *Leishmania* encontradas no estado do Amazonas até o presente trabalho eram *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (Arias e Freitas 1978; Arias *et al.* 1987; Coelho *et al.* 2010). As análises dos alinhamentos das duas sequências representativas desse trabalho apresentaram menos de 1% de divergência entre a sequência de referência do *GenBank* (GU071176.1) de *L. (V.) lainsoni*, de amostras isolados da Bolívia e Peru (Fraga *et al.* 2010), confirmando a identificação espécie *L. (V.) lainsoni* tornando este trabalho o primeiro relato desta espécie no estado do Amazonas. Ainda há poucas informações sobre esta espécie, pois a mesma tem sido associada a poucos casos de leishmaniose, e sua distribuição tem registros somente nos estados do Acre e Pará (Silveira *et al.* 1987, Lainson *et al.* 1992, Tojal *et al.* 2006), e no Peru e Bolívia (Lucas *et al.* 1994, Martinez *et al.* 2001) o que sugere que sua distribuição ainda é subestimada.

7 CONCLUSÕES

A comparação da fauna dos ambientes de terra firme e várzea no médio Solimões mostraram que boa parte da abundância de flebotomíneos está distribuída em poucas espécies e que a composição é alterada em consequência dessa distribuição, resultando em uma fauna com poucas espécies com muitos indivíduos (espécies

dominantes) e muitas espécies com poucos indivíduos (espécies raras). Esta composição variou de acordo com os ecótopos tendendo a ser maior na floresta, porém em peridomicílio houveram espécies sinantrópicas do gênero *Nyssomyia* que são vetores em outras áreas.

E se baseando na alta abundância de *Th. ubiquitalis* associada com os resultados positivos da infecção por *L. (V.) lainsoni*, provavelmente essa espécie é a principal vetora no município de Tefé.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B. 1999. Tatuquiras of the Terra Firme: ecological and public health significance of the subgenus *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) Mangabeira, 1941. p. 519-542. En: Burger, J. F. (ed.). *Contributions to the knowledge of Diptera. Memoirs on entomology*, International, Volume 14. Associated Publishers. Gainesville, Florida. USA. 648p.
- Altschul, S. F. ; Gish, W. ; Miller, W. ; Myers, E. W. ; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tol. *Journal of Molecular Biology*, 215(3) : 403-410.
- Alves, V. R.; Freitas, R. A.; Santos, F. L.; Barrett, T. V. 2011. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (3): 353-359.
- Alves, V. R.; Freitas, R. A.; Santos, F. L.; Oliveira, A. F. J.; Barret, T. V.; Shimabukuro, P. H. F. 2012. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the Amazonas state, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(2): 220-227.
- Anderson, J. M. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26: 32-46.
- Aragão, H. B. 1922. Transmissão da leishmaniose tegumentar no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Bras. Méd.*, 36: 129-130.
- Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1977. Flebotómos da Amazônia Central do Brasil. I. Resultados obtidos das capturas feitas com isca humana e equina. *Acta amaznica*, 7(4): 507-527.

- Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2: incidência de flagelados em flebotomíneos. *Acta amazonica*, 8(3): 387-396.
- Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1982. On vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 3. Phlebotomine sand fly stratification in a terra firme forest. *Acta amazonica*, 12(3): 599-608.
- Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1982. On vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 4. Sand fly emergence from a “terra firme” forest floor. *Acta amazonica*, 12(3): 609-611.
- Arias, J. R.; Freitas, R. A.; Naiff, R. D.; Barrett, T. V. 1987. Observations on the parasite *Leishmania mexicana guyanensis* and its natural infection of the sand fly *Lutzomyia olmeca nociva*. *PAHO Bulletin*, 21(1): 48-54.
- Barbosa, M. G. V.; Ferreira Fé, N.; Ribera Marcião, A. H.; Silva, A. P. T.; Monteiro, W. M.; Guerra, J. A. O. 2008. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5): 485-491.
- Barker, D. C., 1987. DNA probe diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, 3: 177-184.
- Barrett, T. V.; Freitas, R. A.; Albuquerque, M. I. C.; Guerrero, J. C. H. 1996. Report on a collection of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from the middle

- Solimões (Amazonas, Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1): 27-35.
- Brazil, B. G.; Brazil, R. P. 2000. Sexing sand fly pupae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo*, 95(4): 471-472.
- Cabanillas, M. R. S.; Castellón, E. G. 1999. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks on noon-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(3): 289-296.
- Casanova, C.; Costa, A. I. P.; Natal, D. 2005. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 100(7): 719-724.
- Cameron, M. M.; Pessoa, F. A. C.; Vasconcelos, A. W.; Ward, R. D. 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 9: 263-272.
- Castellón, E. G. B.; Fé, N. F.; Buhrnheim, P. F.; Fé, A. F. 2000. Flebotomíneos na Amazônia. II. Listagem das species coletadas na bacia petrolífera no rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(2): 455-462.
- Clem, A. 2010. A current perspective on leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2): 124-126.
- Coelho, L. I. C. C.; Paes, M.; Guerra, J. A. O.; Barbosa, M. G.; Coelho, C.; Lima, B.; Brito, M. E.; Filho, S. P. B. 2010. Characterization of *Leishmania* spp. causing

- cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Res.*, 108: 671-677.
- Comer, J. A.; Tesh, R. B. 1991. Phlebotomine sandflies as vectors of vesiculoviruses. *Parassitologia*, 33: 143-150.
- Costa, A. G.; Alecrim, P. H.; Santos, J. D.; Brandão, J. K. T.; Conceição, L. F.; Heckmann, M. I. O. 2010. Aspectos epidemiológicos da infecção por leishmaniose tegumentar americana (LTA) em pacientes do município de Coari-Amazonas. *Resumo da 62ª Reunião Sociedade Brasileira de Progresso à Ciência (SBPC)*. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3276.htm>>. Acesso em 20/09/2012.
- Coutinho, J. O. 1940. Localização de forma leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*, no faringe de *Phlebotomus pessoai* naturalmente infectado. *Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo*, 16: 163-171.
- Cutollo, A. A.; Galati, E. A. B.; Von Zuben, C. J. 2013. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from forest areas in Botucatu municipality, central western Sao Paulo state, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19: 15.
- Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control. *Clinics in Dermatology*, 14: 417-423.

- Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3): 239-243.
- Dias-Lima, A. G.; Castellón, E. G.; Shellock, I. 2002. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 33(2): 303-316.
- Dias-Lima, A. G.; Castellón, E. G.; Medeiros, J. F.; Shellock, I. 2002. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(3): 823-832.
- Dye, C; Davies, C. R.; Lainson, R. 1991. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Animal Behavior*, 42: 183-182.
- Dufrêne, M.; Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67(3): 345-366.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 1999. Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos e avaliação da aptidão agrícola das terras do pólo Juruá-Solimões, Amazonas. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, Boletim de Pesquisa, n. 2.
- Fé, N. F.; Freitas, R. A.; Barrett, T. V. 1998. Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia*

(*Psychoopygus*) *douradoi* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(3): 331-336.

Feitosa, M. A. C.; Castellón, E. G. 2004. Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Fragmentos de Floresta ao redor de Conjuntos Habitacionais na Cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazonica*, 34: 121-127.

Feitosa, M. A. C.; Castellón, E. G. B. 2009. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na periferia de Santarém (PA). Estratificação horizontal e fatores agravantes para transmissão domiciliar de leishmanioses. *Rev. Colombiana Ciencia Animal*, 1(2): 222-239.

Figueira, E. A. G.; Silva, G.; Chagas, E. C. S.; Shimabukuro, P. H. S. 2013. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, with a description of *Evandromyia* (*Aldamyia*) *apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva sp. nov. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(2): 280-287.

Forattini, O. P.; Santos, M. R. 1952. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em foco de leishmaniose tegumentar americana. *Archivos de Hygiene e Saúde Publica*, 17: 171-174.

Forattini, O. P. Subfamília Phlebotominae. 1973. In: Capítulo 4, p. 119-205. 4ª edição. Editora Edgard Blucher.

Galati, E. A. B; Nunes, V. L. B; Rego Júnior, F. A.; Oshiro, E. T. Chang, M. R. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose

- visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31(4): 378-390.
- Galati, E. A. B. 2003. Morfologia e Taxonomia. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. v. 1. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. p. 23-206.
- Gil, L. H. S.; Basano, A. S.; Souza, A. A.; Silva, M. G. S.; Barata, I.; Ishikawa, E. A.; Camargo, L. M. A.; Shaw, J. J. 2003. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6): 751-755.
- Gomes, A. A. A.; Silva, E. D. O.; Neto, I. C.; Bezerra, T. P. 2004. Leishmaniose mucocutânea: Relato de caso clínico. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial*, 4(4): 223-228.
- Grimaldi, J. G.; Momen, H.; Naiff, R. D.; McMahon-Pratt, D.; Barrett, T. V. 1991. Characterization and classification of leishmania parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 645-661.
- Gontijo, B.; Carvalho, M. L. R. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1):71-80.
- Graça, G. C.; Volpini, A. C.; Romero, G. A. S.; Neto, M. P. O.; Hueb, M.; Porrozzì, R.; Boité, M. C.; Cupolillo, E. 2012. Development and validation of PCR-based

assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5): 664-674.

Guerra, J. A. O.; Ribeiro, J. A. S.; Coelho, L. I. A. R. C.; Barbosa, M. G. V.; Paes, M. G. 2006. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade de São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(11): 2319-2327.

Hutchings, R. S. G.; Sallum, M. A. M.; Ferreira, R. L. M. 2002. Culicidae (Diptera: Culicomorpha) da Amazônia Ocidental Brasileira: Querari. *Acta Amazonica*, 32(1): 109-122.

Hutchings, R. H.; Hutchings, R. S. G.; Sallum, M. A. M. 2008. Distribuição de Culicidae na Várzea, ao longo da calha dos Rios Solimões-Amazonas. In: Albernaz, A. L. K. M.. Conservação da Várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas. Manaus: IBAMA / Pro Várzea, v. Cap.6, p. 133-152.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Acesso em 01/11/2012.

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 2013. Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa. Disponível em <<<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>>. Acesso em 02/04/14.

Killick-Kendrick, R. 1999. *The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in dermatology*, 17:279–289.

Lainson, R.; Shaw, J. J. 1968. Leishmaniasis in Brazil: I. observations on enzootic rodent leishmaniasis incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (mangabeira) as the vector in the lower amazonian basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3): 385-395.

Lainson, R.; Shaw, J. J. 1973. Leishmaniasis in Brazil: IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex: Importance of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *Leishmania braziliensis* in North Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2): 184-196.

Lainson, R.; Shaw, J. J. 1976. Cutaneous leishmaniasis in north Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Transactions of Royal society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2): 171-172.

Lainson, R.; Ward, R. D.; Shaw, J. J. 1976. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 171-172.

Lainson, R.; Shaw, J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick- Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press. p. 12-120.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Souza, A. A. A.; Silveira, F. T.; Falqueto, A. 1992. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(3): 437-439.

- Lainson, R.; Shaw, J. J.; Souza, A. A. A de; Braga, R. R.; Ishikawa, E. A. Y. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3): 435-443.
- Legriffon, C. M. O.; Reinhold-Castro, K. R.; Fenelon, V. C.; Neitzke-Abreu, H. C.; Teodoro, U. 2012. Sandfly frequency in a clean and well-organized rural environment in the State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1): 77-82.
- Lewis, D. J. 1974. The Biology of Phlebotomidae in relationships to leishmaniasis. *Annual Review Entomology*, 19:363-384.
- Lucas, C. M.; Franke, E. D.; Cachay, M. I.; Tejada, A.; Carrizales, D.; Kreutzer, R. D. 1994. Leishmania (Viannia) lainsoni: first isolation in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(5): 533-537.
- Mann, R. S.; Kaufman, P. E.; Butler, J. F. 2007. A Sand Fly, *Lutzomyia shannoni* Dyar (Insecta: Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *EDIS*, EENY 421. Disponível em <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN79700.pdf>>. Acesso em 20/09/2012.
- Marcondes, C. B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, 118(4): 351-356.
- Martinez, E.; Pont, F. L.; Mollinedo, S.; Cupolillo, E. 2001. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 375-377.

- Michalsky, E. M.; Guedes, K. S.; Silva, F. O. L.; França-Silva, J. C.; Dias, C. L. F.; Barata, R. C.; Dias, E. S. 2011. 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*, 44(1): 158-162.
- Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral. 1ª edição, 120 pp. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2ª edição, 189 pp. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- Moraes M. A. P.; Silveira, F. T. 1994. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 36: 459-463
- Odorizzi, R. M. F. N.; Galati, E. A. B. 2007. Flebotomíneos de várzea do rio Aguapeí, região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 41(4): 645-652.
- Oliveira, J. G. S.; Novais, F. O.; Oliveira, C. I.; Cruz-Junior, A. C.; Campos, L. F.; Rocha, A. V. 2005. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica*, 94:55-59.
- Oliveira, G. M. G.; Figueiró Filho, E. A.; Andrade, G. M. C.; Araújo, L. A.; Oliveira M. L. G.; Cunha, R. V. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município

- de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(3): 83-94.
- Oliveira, D. M.; Reinhold-Castro, K. R.; Bernal, M. V. Z.; Legriffon, C. M. O.; Lonardoní, M. V. C.; Teodoro, U.; Silveira, T. G. V. 2011. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(2): 137-143.
- Oliveira, A. J. F.; Aguiar, N. O.; Freitas, R. A.; Pessoa, F. A. C. 2013. New records of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) in the Amanã Sustainable Development Reserve, Amazonas, Brazil. *Revista Uakari*, 9(1): 55-59.
- Oliveira Pereira, Y. N.; Rebêlo, J. M. M.; Moraes, J. L. P.; Pereira, S. R. F. 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(6): 540-543.
- Paes, M. G. 1991. *Estudo de quatro espécies de Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae) em área endêmica de *Leishmaniose Tegumentar Americana* na periferia de Manaus. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas, 112pp.
- Paiva, B. R.; Secundino, N. E. C.; Nascimento, J. C.; Pimenta, P. F. P.; Galati, E. A. B.; Andrade Junior, H. E.; Malafrente, R. S. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, 99:252-259.

- Paiva, B. R.; Secundino, N. E. C.; Nascimento, J. C.; Pimenta, P. F. P.; Galati, E. A. B.; Andrade Júnior, H. E.; Malafrente, R. S.. 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(1): 87-94.
- Pessôa, S. B.; Coutinho, J. O. 1939. Infecção natural de *Phlebotomus pessoai* por formas de leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene*, 10: 139-142.
- Pessôa, S. B.; Pestana, BR. 1940. Infecção natural de *Phlebotomus migoneis* por formas leptomonas, provavelmente *Leishmania braziliensis*. *Acta Medica*, 5(2): 106.
- Pessoa, F. A. C.; Medeiros, J. F.; Barrett, T. V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5): 593-599.
- Pinheiro, M. P. G.; Silva, J. H. T.; Cavalcanti, K. B.; Azevedo, P. R. M.; Ximenes, M. F. F. M. 2013. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 38(2): 307-316.
- Pessoa, F. A. C.; Queiroz, R. G.; Ward R. D. 2001. External morphology of sensory structures of fourth instar larvae of Neotropical species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) under scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(8): 1103-1108.
- Pessoa, F. A. C.; Medeiros, J. F.; Barrett, T. V. 2007. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest:

- abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (5): 593-599.
- Pessoa, F. A. C.; Feitosa, M. A. C.; Castellón, E. G.; Rios-Velásquez, C. M.; Ward, R. D. 2008. Immature stages of two species of *Evandromyia* (*Aldamyia*) and the systematic importance of larval mouthparts within Psychodidae (Diptera, Phlebotominae, Psychodinae). *Zootaxa*, 1740: 1-14.
- Pinheiro, F. G.; Luz, S. L. B.; Franco, A. M. R. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta amazônica*, 38(1): 165-172.
- Queiroz, R. G.; Vasconcelos, I. A. B.; Vasconcelos, A. W.; Pessoa, F. A. C.; David, J. R.; Sousa, R. N.; Alencar, J. E. 1991. Phlebotomine sandfly (diptera: Psychodidae) faunal survey in an American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Parassitologia*, 33: 159-167.
- Queiroz, R. G.; Vasconcelos, A. W.; Vasconcelos, I. A. B.; Pessoa, F. A. C.; Sousa, R. N.; David, J. R. 1994. Cutaneous Leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: Incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité Municipality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 693-698.
- Ramos, R. W. 2012. Efeitos do desmatamento e da densidade populacional humana na abundância e diversidade de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em um assentamento rural na Amazônia Central. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 96 p.

- Rangel, E. F.; Lainson, R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7): 937-954.
- Ready, P. D. 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58: 227-250.
- Rebêlo, J. M. M.; Oliveira-Pereira, Y. N. 2001. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de matas de terra firme e de várzea, do município de Paragominas, estado do Pará, Brasil. *Acta amazonica*, 31(1): 145-154.
- Reis, S. R.; Gomes, L. H. M.; Ferreira, N. M.; Nery, L. R.; Pinheiro, F. G.; Figueira, L. P.; Soares, F. V.; Franco, A. M. R. 2013. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. *Acta amazonica*, 43(1): 123-126.
- RIMA. 2003. Relatório de Impactos Ambientais. Usina Termelétrica de Tefé, Amazonas. 92 pp.
- Rocha, L. C.; Freitas, R. A.; Franco, A. M. R. 2013. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in urban rainforest fragments, Manaus-Amazonas state, Brazil. *Acta tropica*, 126: 103-109.
- Shaw, J. J.; Lainson, R. 1972. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent rodent leishmaniasis (*Leishmania Mexicana amazonensis*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(5): 709-717.

- Silva, D. F.; Freitas, R. A.; Franco, A. M. R. 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, Amazonas. *Neotropical Entomology*, 36(1): 138-144.
- Silva, E. A.; Andreotti, R.; Dias, E. S.; Barros, J. C.; Brazuna, J. C. M. 2008. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology*, 119: 343-348.
- Silva, T. M. N.; Castellón, E. G. 2010. Similaridade da fauna flebotomínica de três fragmentos florestais em área urbana do município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 2(1): 85-92.
- Silva, E. S. S.; Freitas, R. A.; Silva, D. F.; Alencar, R. B. 2010. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(1): 78-81.
- Silva, T. R. R. 2013. Estudo de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) do município de Lábrea, Estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazoans. 104p.
- Silveira, F. T.; Shaw, J. J.; Braga R. R.; Ishikawa, E. 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the state of Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 289-292.
- Silveira, F. T.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Braga, R. R.; Ishikawa, E. E. A.; Souza, A. A. A. 1991. Leishmaniose cutanea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(1): 18-22.

- Silveira, F. T.; Souza, A. A. A.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Braga, R. R.; Ishikawa, E. E. A. 1991. Cutaneous Leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(1): 127-130.
- Silveira, F. T.; Ishikawa, E. A. Y.; De Souza, A. A. A.; Lainson, R. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasitology*, 85: 43-50.
- Silveira, F. T.; Lainson, R.; Corbett, C. E. P. 2004. Clinical and imunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3): 239-251.
- Sinan/SVS/MS. 2013. Sistema de informações de agravos de notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da saúde. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em 24/02/2014.
- Shimabukuro, P. H. F.; Galati, E. A. B. 2011. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo state, Brazil, with notes on their geographical distribution. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0361101a20>
11. Acesso em 15/08/12.

- Shimabukuro, P. H. F.; Galati, E. A. B. 2011. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 51(27): 339-441.
- Tamura, K. ; Dudley, J. ; Nei, M. ; Kumar, S. 2007. MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8) : 1596-1599.
- Teodoro, U.; Filho, V. L. S.; Lima, E. M.; Misuta, N. M.; Verginassi, T. G.; Ferreira, M. E. M. C. 1991. Leishmaniose tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no Norte do Paraná, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 25(2): 129-133.
- Teodoro. U.; Silveira, T. G. V.; Santos, A. R.; Dias, A. C. 2001. Luz e aves como atrativos de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 45(3): 167-172.
- Teodoro. U; Lonardoni, M. V. C. ; Silveira, TCV; Dias, AC; Abbas, M; Alberton, D; Santos, DR. 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia withmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 41(3): 383-388.
- Tesh, R. 1988. The genus *Phlebovirus* and its vectors. *Annual Reviews Entomology*, 33: 169-181.
- Tesh, R.; Guzman, H. 1996. Sand flies and the agents they transmit. In: BJ Beaty & WC Marquardt (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado, USA, p. 117-127.
- Thompson, H. D.; Higgins, D. G. ; Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

Trindade, R. L.; Gorayeb, I. S. Maruins (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), após a estação chuvosa, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2): 121-130.

Tojal da Silva, A. C.; Cupolillo, E.; Volpini, A. C.; Almeida, R.; Romero, G. A. S. 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, 11(9): 1388-1398.

Willians, P. 1993. Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88 (2): 177-183.

World Health Organization (WHO). 2013. Leishmaniasis. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 20/01/2014.

Verberk, W. C. E. P., van der Velde, G.; Esselink, H. 2010. Explaining abundance-occupancy relationships in specialists and generalists: A case study on aquatic macroinvertebrates in standing waters. *Journal of Animal Ecology* 79, 589–601.

Verberk, W. 2012. Explaining general patterns in species abundance and distributions. *Nature education knowledge*, 3(10): 38.

Young, D. G.; Duncan, M. A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomology Institute*, 54:1-881.