



INPA

INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA

Programa de Pós-Graduação

Divisão do Curso de Entomologia - DCEN

Efeitos do desmatamento e da densidade populacional humana na
abundância e diversidade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um
assentamento rural na Amazônia Central

Walkyria Rodrigues Ramos

Manaus – AM

Junho de 2012

Walkyria Rodrigues Ramos

Efeitos do desmatamento e da densidade populacional humana na
abundância e diversidade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um
assentamento rural na Amazônia Central

Orientador: Dr. Jansen Fernandes Medeiros

Co-orientador: Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, do Instituto de Pesquisas da Amazônia- INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

Manaus, Amazonas
Junho de 2012

MEMBROS DA BANCA JULGADORA

Dr. Eloy Castellón Bermudez

Dr. Jorge Augusto de O. Guerra

Dra. Maria de Nazaré T. da Silva

Dr. Victor Py-Daniel (Suplente)

FICHA CATALOGRÁFICA

R175 Ramos, Walkyria Rodrigues

Efeitos do desmatamento e da densidade populacional humana na abundância e diversidade de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em um assentamento rural na Amazônia Central / Walkyria Rodrigues Ramos.---

Manaus : [s.n.], 2012.

xv, 72 f. : il.

Dissertação (mestrado) --- INPA, Manaus, 2012

Orientador : Jansen Fernandes Medeiros

Coorientador : Felipe Arley Costa Pessoa

SINOPSE

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do desmatamento e densidade populacional humana nas populações de flebotomíneos em um assentamento rural no município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

Palavras-Chaves: Phlebotominae, *Leishmania*, Amazônia Central, Desmatamento

Keywords: Phlebotominae, *Leishmania*, Central Amazon, Deforestation

Aos meus pais Vilma Gomes e Waldir Ramos, por todo apoio, compreensão e amor dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao curso de Pós-graduação em entomologia e ao CNPq pela concessão da bolsa;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz-AM) por todo suporte logístico e laboratorial;

A minha família, Vilma Ramos, Waldir Ramos e Waldir Júnior. Mãe e pai, obrigada por mais uma vez serem meu porto seguro, mesmo a distância; obrigada por respeitar minhas escolhas, por entender minha ausência e pelo amor incondicional; Mano, obrigada pela amizade e por me fazer rir nos momentos mais difíceis. Amo vocês até o infinito!

Aos meus orientadores, Dr. Jansen F. Medeiros e Dr. Felipe A.C. Pessoa, por aceitarem o desafio de me orientar, por terem aberto a porta dos seus laboratórios, por todos os conselhos, por tantos ensinamentos, por serem sempre acessíveis e atenciosos, e especialmente, por toda paciência. A paciência que vocês tiveram comigo esses dois anos é proporcional ao meu respeito por vocês.

A Msc. Cláudia Velasquez, por todas as conversas, conselhos, puxões de orelha, ensinamentos e dicas sobre biologia molecular, e pela paciência comigo e minha (des)organização; enfim, por ter sido tão “orientadora” por esses dois anos.

Ao Dr. Sérgio Luz por aceitar minha participação no projeto do CT-Amazônia e a Msc. Tatiana Pires e a Priscila Andrade por todo suporte molecular;

A toda equipe que participou da elaboração do desenho amostral e coletas, Dr. Fernando Franch-Abad, Dr. Gonçalo Ferraz, Dr. Sylvain Desmoulière, Dr^a. Genimar Julião e Msc. Walter Santos.

Ao PAPE –FIOCRUZ CNPq, projeto 403572/008-8 - A biologia do processo de interação do *Lutzomyia umbratilis* com a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, coordenação do Dr. Felipe A.C. Pessoa, pelo financiamento parcial dos reagentes.

Aos colegas de laboratório, Yumi, Érica, Jéssica, Laura, Davi, Diego e Ricardo (Mota) pela ajuda nas montagens das lâminas e pela convivência sempre agradável e animada.

Agradeço especialmente a Suelen Karen e Rômulo Celestino, por nossa amizade ter ultrapassado as paredes do laboratório; Suelen, muito obrigada por me emprestar seus ouvidos por horas a fio, por sempre me ajudar a ver o lado bom dos acontecimentos, pelos filmes, passeios, diversões e por me emprestar seu quarto e sua família sempre que eu me sentia só;

Rômulo, obrigada por sempre estar disposto a discutir artigos, trocar idéias ou simplesmente sentar no chão, tocar violão e sonhar com o futuro;

A família Félix, Dona Cris, Seu Val, e Igor, por me acolherem e por fazerem com que eu realmente me sentisse em casa nos últimos meses. Obrigada pelos conselhos, pela convivência, pelas risadas e por terem cuidado de mim tão bem.

Ao Clayton Gonçalves por esses dois anos de intensa convivência sobre o mesmo teto; Tom, obrigada pela amizade, pelo companheirismo, por me fazer chorar de rir e rir quando queria chorar; obrigada por compartilhar sua vida e fazer parte da minha, nos momentos bons e ruins.

As minhas amigas Suzane Velasques e Raylenne Araújo, que estando longe ou perto, sempre se fizeram presentes; pelos conselhos, por “ouvirem” meus dramas, por sempre me animarem e por acreditarem em mim.

Aos meus amigos, Dibbiê Albuquerque, Lidiane Melo, Pollyana Amorim, Tayrine Lacerda, Alisson Gonçalves, Jéssica Ione, Gisele Martins, Raissa Aimê, Roberta Miranda, Lidianne Salvatierra e Maeli Ferreira por todos os momentos de alegria, pelas festas, pelas danças, por todo riso, por todo choro e especialmente por terem me mostrado que amigos se fazem presente nos momentos mais difíceis. Sem vocês Manaus não teria a menor graça;

Aos meus colegas de turma pela convivência, em especial a Ledayane Barbosa e Josenir Câmara por todos os momentos, conselhos e dicas;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha vida nesses dois últimos anos.

*“E aqueles que foram vistos dançando,
foram julgados insanos por aqueles que
não podiam escutar a música.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Os flebotomíneos são vetores de diversos parasitos, incluindo flagelados que causam leishmanioses em regiões tropicais e subtropicais. São encontrados principalmente em florestas, porém, o impacto causado pelo desmatamento e a subsequente colonização dessas áreas, tem induzido a adaptação de algumas espécies a ambientes antropizados. Sob esta premissa, foi realizado um estudo da fauna de flebotomíneos no Assentamento Rural de Rio Pardo, no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, para identificar as associações entre mudanças ambientais antrópicas na fauna de flebotomíneos. Foram observadas a abundância e diversidade de flebotomíneos em quatro categorias com diferentes graus de desmatamento e densidade populacional humana: G1. Alta densidade populacional humana e baixa cobertura florestal; G2. Baixa densidade populacional humana e baixa cobertura florestal; G3. Alta densidade populacional humana e alta cobertura florestal; G4. Baixa densidade populacional humana e alta cobertura florestal. Em cada categoria foram realizadas seis coletas nos ambientes de peridomicílio, floresta, borda de floresta, pomar e capoeira através de armadilhas luminosas do tipo CDC do período de 18:00 às 6:00 nos meses de junho, julho e agosto de 2009 e setembro, outubro e novembro de 2010. Foram capturados 3.073 indivíduos, sendo 1.163 fêmeas (37,8%) e 1.910 machos (62,2%) distribuídos em 13 gêneros e 53 espécies. Os gêneros mais abundantes foram *Nyssomyia* e *Psychodopygus*. Dentre as espécies capturadas, cinco são incriminadas como vetoras de *Leishmania*: *Nyssomyia antunesi* (1.025 indivíduos), *Nyssomyia umbratilis* (448), *Trichophoromyia ubiquitalis* (164), *Psychodopygus amazonensis* (82) e *Bichromomyia flaviscutellata* (76), todas encontradas principalmente nos ambientes de floresta e peridomicílio. A maior abundância de indivíduos foi observada nas categorias G3 e G1 ambas com uma alta densidade populacional humana, porém, essa diferença não foi estatisticamente relevante em relação as outras categorias; Foi encontrado uma maior diversidade de espécies nas categorias G3 e G2. Entre os ambientes estudados, a maior abundância de flebotomíneos foi observada no peridomicílio e floresta Os resultados indicam que os diferentes graus de desmatamento e densidade populacional humana afetam de maneira semelhante as populações de flebotomíneos, ou seja, mesmo em locais com elevado desmatamento e densidade populacional humana, a fauna de flebotomíneos pode ser diversificada e abundante.

ABSTRACT

The sand fly are vectors of many parasites, including flagellates which cause leishmaniasis in tropical and subtropical regions. These insects can be found predominantly in forests, however, the impact of deforestation and subsequent colonization of these areas shown that the adaptation of some species in these environments. Under these premises, we realized a study of the sand flies fauna from Rio Pardo settlement, Presidente Figueiredo Municipality, Brazil. We observed the abundance and diversity of sand flies in four categories with different degrees of deforestation and human population density: G1. High human population density and High deforestation; G2. Low human population density and high deforestation; G3. High human population density and low deforestation; G4. Low human population density and low deforestation. Material and Methods: in each category six collections were done in the following environments - forest, edge of forest, shrub, peridomicile and orchard with light traps (CDC); overnight in the months June, July, August 2009 and September, October, November 2010. A total of 3.073 specimens were collected, 1.163 females (37,8%) and 1.910 males (62,2%), and identified in 13 genera and 53 species. The most abundant genera were *Nyssomyia* and *Psychodopygus*. Some species captured five are incriminated as vectors of *Leishmania*: *Nyssomyia antunesi* (1.025 individuals), *N. umbratilis* (448), *Trichophoromyia ubiquitalis* (164), *Psychodopygus amazonensis* (82) e *Bichromomyia flaviscutellata* (76), found in forest and peridomicile. The largest abundances of species were observed in categories G1 and G3, both with high human population density; although these differences were not statistically significant when compared with others; the Shannon-Wiener Indices shown the diversities in categories G2 and G3. Among these environments, the largest sandflies abundance was observed in the peridomicile and forest environments. Main conclusions: The results may suggest that even in area with high degree of deforestation and high human population, the abundance and diversity of sand flies still maintain in high numbers. Probably, human population densities produce favorable locations for maintenance life cycle of several species, providing potential site for breeding, resting, reproduction and availability of sources meal.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	XII
Lista de figuras	XIII
Lista de siglas	XVI
1. Introdução	1
1.1 Flebotomíneos	1
1.2 Agentes etiológicos e Leishmaniose Tegumentar Americana	3
1.3 Desmatamentos e densidade humana e possíveis efeitos em vetores	6
2. Objetivos	9
2.1 Geral	9
2.2 Específicos	9
3. Hipóteses	10
4. Material e Métodos	11
4.1 Área de coleta	11
4.2 Desenho Amostral	15
4.3 Dados entomológicos	17
4.4 Padronização do protocolo para o diagnóstico molecular na detecção da infecção natural em flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	18
4.4.1 Extração de DNA	18
4.4.2 Construção de controles	20
4.4.2.1 Controles negativos	20
4.4.2.2 Controles positivos	20
4.4.3. Condições das reações	21
4.4.4. Testes das amostras dos flebotomíneos das coletas	21
4.4.4.1. Confirmação da extração de DNA	21
4.4.4.2 Condições da reação	22
4.4.4.3. Teste de infecção natural	22

4.5 Análise de dados	23
5. Resultados	25
5.1 Abundância de flebotomíneos	25
5.2 Categorias de UDS	26
5.2.1 - Abundância de espécies de flebotomíneos por UDS	26
5.2.2. Diversidade, equitabilidade, similaridade e riqueza de espécies de flebotomíneos por categoria de UDS	29
5.3 Ambientes	33
5.3.1 Abundância de flebotomíneos	33
5.3.2 Diversidade, equitabilidade, similaridade e riqueza de espécies de flebotomíneos	37
5.4 Vetores	39
5.5 Taxa de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em vetores	43
5.5.1 Construção de controles	43
5.5.2. Testes das amostras dos flebotomíneos das coletas:	44
6. Discussão	46
6.1. Abundância e diversidade geral	46
6.2. Abundância, diversidade, similaridade e riqueza por categoria de UDS	47
6.3. Abundância, diversidade, similaridade e riqueza por ambiente	49
6.4. Abundância de espécies vetoras	51
6.5. Taxas de infecção natural	53
7. Conclusões	55
8. Referências	56

Apêndice A	70
Apêndice B	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmulas dos índices de diversidade, equitabilidade e similaridade utilizadas no estudo -----	22
Tabela 2. Número de amostras (N), número de eventos (n), total de indivíduos (TI), índice de Shannon & Wiener (H') e equitabilidade de Pielou (J') por categorias de UDs, obtidos no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----	28
Tabela 3. Espécies de flebotomíneos e suas devidas proporções capturadas por ambientes (Floresta, Borda, Peridomicílio, Capoeira e Pomar) no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----	32
Tabela 3. (continuação). Espécies de flebotomíneos e suas devidas proporções capturadas por ambientes (Floresta, Borda, Peridomicílio, Capoeira e Pomar) no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----	33
Tabela 4. Número de amostras (N), número de eventos (n), total de indivíduos (TI), Índice de Shannon & Wiener (H') e equitabilidade de Pielou (J') por ambientes, obtidos no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----	35
Tabela 5. Espécies de flebotomíneos que transmitem leishmaniose no Brasil, coletados no assentamento rio Pardo, Município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil-----	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização de Presidente Figueiredo. Fonte: Modificado de Chagas *et al.*, 2006-----
-----10
- Figura 2. Assentamento agrícola de Rio Pardo; em amarelo as áreas desmatadas, em verde as área com cobertura vegetal preservada, as linhas vermelhas indicam os ramais e os triângulos representam as moradias. Fonte: Sylvain Desmoulière -----12
- Figura 3. Moradias em Rio Pardo, (F) base permanente de pesquisa do ILMD. Fonte: Felipe A.C. Pessoa -----13
- Figura 4. Ilustração do procedimento de seleção de UDs em função de suas características ambientais básicas (desmatamento e densidade populacional humana) na comunidade de Rio Pardo. Cada residência foi identificada por um código numérico; a UD é definida como a residência e a área de 300 m de raio ao redor dela (círculos amarelos). Fonte: Sylvain Desmoulière -----15
- Figura 5. Protocolo de extração de DNA (DNeasy® Blood and Tissue Kit: DNeasy Mini Spin Colunas- Qiagen): -----18
- Figura 6. Rank de abundância de indivíduos amostrados segundo as categorias G1 e G2 em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----25
- Figura 6. Rank de abundância de indivíduos amostrados segundo as categorias G3 e G4 em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----26
- Figura 7. Índices de similaridade (Jaccard) entre as categorias amostradas G1, G2, G3 e G4, em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas-----28
- Figura 8. Curvas de rarefação representando a riqueza cumulativa das espécies nas quatro categorias de Uds no Assentamento de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. A riqueza de espécies (número estimado de espécies em cada UD dado pela igualdade de tamanhos de amostra) foi rarefado a partir do número de indivíduos nas UDs considerando a menor abundância de flebotomíneos (●). Círculos fechado e aberto (●, ○) indicam riqueza de espécies e as letras indicam a densidade de espécies (A, B, C) (ver Tabela 3). A riqueza de espécies e os valores de densidade são o mesmo em D (●). A curva central, representadas por linhas pontilhada e não pontilhadas de cor preta, corresponde a média das curvas geradas com

a ordem aleatória de amostras de cada UD; as curvas em cinza representam o desvio padrão associado a cada ponto da curva. Categoria G1 = B; Categoria G2 = A; Categoria G3 = C; Categoria G4 = D -----30

Figura 9. Abundância de flebotomíneos nos ambientes de floresta, borda, peridomicílio, capoeira e pomar, coletados no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, 2009 - 2010. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, segundo o teste de Kruskal – Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$)-----34

Figura 10. Índices de similaridade (Jaccard) entre os ambientes de floresta, borda, peridomicílio, capoeira e pomar, no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, 2009 – 2010-----37

Figura 11. Abundância das espécies de flebotomíneos vetoras de leishmanioses por ambientes (a): *Bichromomyia flaviscutelata*, (b): *Psychodopygus amazonensis*, (c): *Nyssomyia umbratilis*, (d): *Nyssomyia antunesi*, (e): *Trichophoromyia ubiquitalis*, coletados em rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, após um Kruskal – Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$)-----40

Figura 11 (continuação). Abundância das espécies de flebotomíneos vetoras de leishmanioses por ambientes (a): *Bichromomyia flaviscutelata*, (b): *Psychodopygus amazonensis*, (c): *Nyssomyia umbratilis*, (d): *Nyssomyia antunesi*, (e): *Trichophoromyia ubiquitalis*, coletados em rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, após um Kruskal – Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$)-----41

Figura 12. Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA ladder 100 pb (L) dos controles positivos (CP) contendo fêmeas de *N. umbratilis* infectadas naturalmente e machos de *M. migonei* oriundos de colônias de laboratório. Controles positivos: 1i (1 fêmea infectada), 2i (1 fêmea infectada e 4 machos), 3i (1 fêmea infectada e 9 machos), 4i (1 fêmea infectada e 14 machos) e 5i (1 fêmea infectada e 19 machos); Controle negativo (CN): pools de machos de *M. migonei*-----43

Figura 13. PCR usando *primers* específicos para Citocromo Oxidase I. Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA *ladder* 100 pb (L) das amostras de *N. umbratilis* e *B.flaviscutellata* oriundas do Assentamento de Rio Pardo juntamente com os controles positivos (CP) (DNA de machos de *M. migonei*) e branco (B)-----44

Figura 14. PCR usando *primers* específicos para tripanossomatídeos. Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA *ladder* 100 pb (L) das amostras de *N. umbratilis* e *B.flaviscutellata* oriundas do Assentamento de Rio Pardo juntamente com os controles positivos (CP) e controle negativo (CN)-----45

LISTA DE SIGLAS

BM	Banho Maria
CCJ	Índice de Jaccard
CDC	Centers of Disease Control
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI	Cytocrome oxidase I
CP	Controle Positivo
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
CN	Controle Negativo
CM	Controle positivo para <i>Trypanossoma (Megatrypanum) spp.</i>
D.D.T	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfatado
DP	Densidade Populacional
H'	Índice de diversidade de Shannon-Wiener
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
J'	Índice de Pielou
LC	Leishmaniose Cutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MgCl	Cloreto de Magnésio
MS	Ministério da Saúde

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRODES	Projeto de Monitoramento do Desflorestamento na Amazônia Legal
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA (Tampão)
UD	Unidade domiciliar

1. INTRODUÇÃO

1.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae; medem de 2 a 4 mm, com pernas longas e corpo delgado, sendo este juntamente com as asas revestidos por cerdas; a sua coloração varia de amarelo claro a marrom escuro, podendo apresentar o escudo bicolor em algumas espécies; quando em repouso as asas permanecem eretas. Estes insetos são conhecidos popularmente como tatuquiras, mosquito-palha, cangalha, cangalhinha e birigui dentre outros (Forattini, 1973).

São insetos de hábitos noturnos e crepusculares, com poucas espécies ativas durante o dia. Podem ser encontrados em troncos de árvores, cavernas, tocas de animais e locais geralmente úmidos (Killick-Kendrick, 1999). Seu voo é caracterizado por ser curto, se assemelhando a pequenos saltos, são holometábolos; as fêmeas em laboratório podem colocar até 60 ovos; as larvas possuem quatro estádios e se desenvolvem em locais úmidos, ricos em matéria orgânica vegetal enquanto os adultos são fitófagos e também se alimentam da substância açucarada produzida pelos pulgões; as fêmeas também praticam hematofagia (Forattini, 1973; Cameron *et al.*, 1995).

Possuem ampla distribuição geográfica (Lewis, 1971), são encontrados em diversas condições climáticas e em variadas altitudes, em ambientes silvestres, rurais, peri-urbanos e mais recentemente em áreas totalmente urbanizadas (Teodoro *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2010).

Existem aproximadamente 800 espécies no mundo, sendo 464 registradas na região neotropical até 2003. No Brasil, são encontradas 229 espécies com maior diversidade na região amazônica com 162 espécies descritas, destas 112 podem ser encontradas no Estado do Amazonas que apresenta 49% da fauna nacional de flebotomíneos (Young e Duncan, 1994; Galati, 1995; Aguiar e Medeiros, 2003; Castellon, 2009).

Além de transmitirem *Leishmania* (Ross), são vetores de diversas outras espécies de tripanossomatídeos, bactérias e vírus (Forattini, 1973; Acevedo e Arrivillaga, 2008). No Brasil, as principais espécies incriminadas como vetoras das leishmânias são *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Frahia), *N. whitmani* (Nunes & Coutinho), *N. intermedia* (Lutz & Neiva), *N. neivai* (Pinto), *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira), *Psychodopygus wellcomei*

(Frahia, Shaw & Lainson), *Migonemyia migonei* (França) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (SVS/MS, 2007; Souza *et al.*, 2008; Rangel e Lainson, 2009).

A espécie *N. umbratilis* é considerada a mais importante vetora de leishmaniose tegumentar americana (LTA) humana na região centro-norte da Amazônia (Lainson *et al.*, 1994), onde transmite *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Floch) que é responsável por mais de 95% dos casos dessa doença (Romero *et al.*, 2002). A *Nyssomyia umbratilis* é frequentemente capturada em base de árvores, picando o homem ao ser perturbada; sobem gradativamente para a copa das árvores, à medida que vai anoitecendo, em busca de repasto sanguíneo, que é feito geralmente em animais arborícolas como a preguiça (*Choloepus didactylus*, Linnaeus) e o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*, Linnaeus) (Arias e Freitas, 1978; Ryan *et al.*, 1986). Em áreas sinantrópicas a mucura (*Didelphis marsupialis*, Linnaeus) tem se mostrado um importante hospedeiro de leishmânias, como observado por Arias e Naiff (1981) em Manaus.

Apesar de ser encontrada em ambos os lados do rio Amazonas, a espécie *N. umbratilis* tem sido observada infectada com *L. (V.) guyanensis* apenas na calha norte; Arias e Freitas (1978) sugerem que o rio funciona como uma barreira na distribuição do ciclo dessa leishmânia onde, na calha Sul, *N. umbratilis* não é incriminado como vetor; este fato levanta a hipótese que, na verdade, *N. umbratilis* é um complexo de espécies. Justiniano *et al.*, (2004) estudando duas populações diferentes de *N. umbratilis* criadas em laboratório, uma proveniente de Manaus e outra de Manacapuru, observaram diferenças na ovoposição, ciclo de vida, morfologia larval e sobrevivência dos adultos reforçando a hipótese do complexo de espécies.

Ao sul da Amazônia Legal, em áreas de florestas primárias e secundárias, o principal vetor de *L. (Leishmania) amazonensis* (Lainson & Shaw) é *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira) (Arias e Freitas, 1978) tendo *B. olmeca nociva* (Young & Arias) e *B. reducta* (Feliciangeli, Ramirez-Pérez & Ramirez) como vetores secundários (SVS/MS, 2007). Essa leishmânia é responsável pela maioria dos casos da leishmaniose cutânea difusa na Bacia Amazônica (Rêbello e Oliveira-Pereira, 2001). A espécie *B. flaviscutellata* se adapta muito facilmente a diversos tipos de ambiente, porém, é pouco antropófila, se alimenta preferencialmente de sangue de mamíferos terrestres, tais como roedores do gênero *Proechimys* (Allen) e *Oryzomys* (Baird) (Lainson e Shaw, 1987; Ryan *et al.*, 1986).

Muitas espécies de flebotomíneos primariamente de ambientes florestais têm se mostrado bem adaptadas a áreas menos florestadas, especialmente no peridomicílio onde existem abrigos de animais (galinheiros, chiqueiros e currais) (Rangel e Lainson, 2009). Feitosa e Castellon (2004) estudaram a fauna de flebotomíneos ao redor de conjuntos habitacionais em Manaus, e observaram que mais de 70% das espécies capturadas eram antropófilas, sendo as espécies mais abundantes *N. umbratilis* e *T. ubiquitous* (Mangabeira), ambas vetoras de leishmânias na região Norte. Estudos mostraram, ainda, que além de serem capturadas em áreas urbanas, algumas espécies de flebotomíneos têm realizado repasto sanguíneo em humanos nessas áreas, o que pode aumentar as chances de infecção por leishmânias (Aguilar *et al.*, 1987; Nery *et al.*, 2004).

Durante a implantação do bairro Cidade Nova, em Manaus, Paes (1991) observou a presença de espécies vetoras de leishmânias (*N. umbratilis* e *N. anduzei*) nos peridomicílios. Nunes *et al.*, (2008), em um estudo da fauna de flebotomíneos em Bonito, no Mato Grosso do Sul, mostraram que as duas espécies mais abundante no peridomicílios numa área urbana foram *L. longipalpis*, principal vetor de leishmaniose visceral (LV) no Brasil, e *B. flaviscutellata*. Ambas as espécies foram encontradas naturalmente infectadas por flagelados.

1.2 Agentes etiológicos e Leishmaniose Tegumentar Americana

O gênero *Leishmania* pertence à família Tripanosomatidae, ordem Kinetoplastida; são parasitas digenéticos com dois estágios no ciclo de vida: um estágio extracelular no hospedeiro invertebrado (forma promastigota flagelada), também encontrada em isolamentos em meios de cultura, e um intracelular no hospedeiro vertebrado (forma amastigota) (Bañuls, 2007).

O ciclo se inicia quando a fêmea de flebotomíneo ingere formas amastigotas da leishmânia durante o repasto em um mamífero infectado. As formas intracelulares são liberadas no intestino do vetor, onde se diferenciam em várias etapas até as formas promastigotas metacíclicas infectantes e migram então para a probóscide do inseto, onde poderão infectar um hospedeiro vertebrado durante novo repasto. No hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas na pele lacerada. Essas formas sofrem fagocitose por parte dos macrófagos, se diferenciam em amastigotas e se reproduzem por

divisão binária e infectando novas células fagocitárias que serão ingeridas pelo vetor durante repasto reiniciando o ciclo (Dedet *et al.*, 1999; Bañuls, 2007; Bittencourt, 2008; Bates, 2008).

Aproximadamente 30 espécies de leishmânias já foram descritas, porém, apenas 10 apresentam interesse médico e veterinário (Bates, 2007). No Brasil as principais espécies responsáveis pelas Leishmanioses tegumentares são *L. (V.) braziliensis* (Vianna) e *L.(V.) guyanensis* além de outras espécies menos frequentes, tal como a *L.(V.) naiffi* e a *L. (L.) amazonensis* (SVS/MS, 2007).

O método clássico para detecção de infecção natural em flebotomíneos por leishmânias é a dissecação de fêmeas recém capturadas (Lainson e Shaw, 1968; Galati *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2008).

As taxas de infecção detectadas pelo método de dissecação normalmente são baixas, Neitzke *et al.* (2008) observaram uma taxa de infecção através de infecção de apenas 0,04% em uma região endêmica de Leishmaniose no Paraná. Baixas taxas de infecção em flebotomíneos também foram observadas por Kato *et al.* (2005) no Equador e por Luz *et al.*, (2000) no Paraná. Apesar da região norte apresentar taxas de infecção natural maiores que em outras regiões do país, a detecção através da observação do tubo digestivo de flebotomíneos ainda é baixa, como foi observado nos estudos de Pinheiro *et al.*, (2008) e Freitas *et al.*, (2012). O baixo percentual de infectividade natural dos flebotomíneos silvestres dificulta o diagnóstico da infecção (Killick-Kendrick, 1990; Silva e Gomes, 2001) e normalmente após a observação em microscópio é necessária uma confirmação da infecção através do cultivo dos parasitas isolados ou inoculação dos mesmos em animais de laboratório (Forattini *et al.*, 1972; Neitze *et al.*, 2008), o que demanda um tempo maior para obtenção de resultados.

Apesar desse método ter sido bastante aplicado nas últimas décadas e do seu baixo custo, essa técnica demanda mais tempo e necessita pessoal treinado para realizar a dissecação além da baixa sensibilidade e especificidade; Esses fatos mostram que é necessário a utilização de técnicas que demandem menos tempo e sejam mais sensíveis para detecção natural por tripanossomatídeos.

Atualmente, outro método com maior sensibilidade está sendo utilizado, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde um fragmento do DNA alvo da leishmânia é amplificado através da ação de *primers* específicos. Essa técnica apesar de ter um custo mais elevado, tem sensibilidade mais alta e pode ser realizada com indivíduos armazenados em álcool e é

possível processar um grande número de amostras aumentando a praticidade de utilização do método (Michalsky *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2006). Além de ser utilizada para detecção de infecção natural em vetores, a PCR tem sido empregada para detecção de infecção em reservatórios e auxiliando diagnóstico em pacientes com leishmaniose (Guerra *et al.*, Guerra *et al.*, 2011).

A leishmaniose é uma doença infecciosa que em geral se apresenta na forma de úlcera cutânea com bordas elevadas e fundo granuloso acometendo a pele e mucosa das vias aéreas superiores, nos casos de Leishmaniose cutânea e mucocutânea e, dependendo da espécie do parasita, pode acometer fígado e baço nos casos de leishmaniose visceral (SVS/MS, 2007).

Nas Américas existem vestígios arqueológicos da presença da leishmaniose cutânea desde o tempo pré-colombiano, através da representação de pessoas com lesões de pele e nariz representados em antigos huacos (vasos) peruanos datados do Séc. I a.C; textos do século XV e XVI durante a colonização espanhola também mencionaram a presença de agricultores com úlceras na pele nos Andes (Oumeish, 1999). A disseminação na América do Sul se deu principalmente pela exposição de soldados, mineiros e exploradores a vetores do parasita na Bacia Amazônica e pelos movimentos de migração aumentando a interação entre hospedeiros e vetores potenciais (Ashford, 2000).

Atualmente as leishmanioses são um importante problema de saúde pública ocorrendo em mais de 100 países com temperatura tropical e subtropical. A leishmaniose visceral (LV) está concentrada na África Oriental, especialmente no Sudão e Kênia e no subcontinente indiano, em Bangladesh, nordeste da Índia e Nepal (Ashford, 2000); a leishmaniose cutânea (LC) ocorre em 88 países, estando concentrada principalmente em áreas áridas e semi-áridas em cidades com alta densidade populacional da Ásia Central como é o caso de Aleppo na Síria e Kabul no Afeganistão (Ashford, 2000); segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são notificados 300 mil novos casos de LC por ano no mundo, porém, as estimativas de novas infecções ultrapassam 1,5 milhões de casos (Gontijo e Carvalho, 2003; Mathers *et al.*, 2006).

No Brasil, a doença é amplamente distribuída, sendo encontrada em todos os estados, com um total de 528.180 novos casos nos últimos 18 anos, sendo a região norte com o maior número de casos anuais onde foram registrados 190.876 mil no mesmo período (Gontijo & Carvalho, 2003; Sinan/SVS/MS, 2009). No estado do Amazonas a LTA é a segunda endemia mais prevalente causada por protozoários veiculada por insetos hematógagos; dos 190.876

casos registrados na região norte entre 1990 e 2008, 38.765 foram notificados no referido estado (Sinan/SVS/MS, 2009). No assentamento de Rio Pardo, local aonde foi realizado o presente trabalho que está localizado município de Presidente Figueiredo, Amazonas, 47% das casas havia pelo menos um caso de leishmaniose totalizando 61 casos registrados da doença até 2009, onde os homens apresentaram uma maior frequência da doença (Soares, 2010).

O aumento de número de casos humanos de LTA está relacionado à derrubada de árvores para novos empreendimentos e colonização humana, como hidrelétricas, construção de novos povoados e assentamentos agrícolas (Forattini *et al.*, 1959; Lainson e Shaw, 1973; Lainson *et al.*, 1973). Após o desmatamento, os mamíferos reservatórios das leishmânias abandonam a área e conseqüentemente os flebotomíneos migram em busca de repasto sanguíneo, podendo se alimentar em pessoas que moram próximas a áreas desmatadas. Algumas espécies de flebotomíneos consideradas silvestres podem se adaptar a novos ambientes e estabelecer um ciclo peridomiciliar, inclusive em áreas urbanas (Marzochi, 1989; Lainson *et al.*, 1994; Desjeux, 2001; Guerra *et al.*, 2007; Feitosa e Castellon, 2009).

As leishmanioses até a década de 1980, no Brasil, eram tidas como doenças tipicamente de áreas rurais e de florestas, sendo esse perfil modificado para a região Nordeste e Sudeste, com endemias urbanas de leishmaniose tegumentar e visceral canina e, com eventuais casos humanos e o registro de coletas de seus vetores como mencionado nos estudos de Amorá *et al.* (2010), Carvalho *et al.* (2010), Kawa *et al.* (2010).

1.3 Desmatamentos e densidade humana e possíveis efeitos em vetores

As mudanças ambientais (desmatamento, urbanização desorganizada, níveis de CO₂ na atmosfera, fenômeno de variação sazonal da temperatura do oceano pacífico (El Niño), aumento da temperatura global, acúmulo de lixo nos rios, construção de rodovias e ferrovias dentre outras) exercem uma grande influência no surgimento e proliferação de doenças parasitárias, alterando o equilíbrio ecológico e o modo como hospedeiros, vetores e parasitas se desenvolvem e transmitem doenças (Lainson e Shaw, 1973; Patz, 2000; Guerra *et al.*, 2007). A diversidade, abundância, competência vetorial e comportamento dos vetores podem ser alterados por qualquer mudança ocorrida quando a estabilidade ecológica é interrompida

(Patz, 2000). Pessoa *et al.*, (2007) estudaram a fauna dendróbata de flebotomíneos antes e depois do corte seletivo de madeira, em uma floresta amazônica, e observaram a redução significativa da abundância de indivíduos, porém as taxas de infecção se mantiveram altas mesmo após o corte de madeira.

O desmatamento é uma das mudanças que mais afetam as populações de vetores, particularmente o desmatamento de florestas tropicais úmidas que exercem grande influência sobre a rapidez das mudanças ambientais globais. Essas alterações favorecem a formação de criadouros de vetores, como é o caso de anofelinos e outros culicídeos, assim como, condições para que essas populações se estabeleçam. Caso haja instalação de novos núcleos de ocupação humana no local, pode ocorrer o aumento da interação entre populações humanas não imunes a determinadas endemias com vetores e parasitas (Walsh *et al.*, 1993; Jardine *et al.*, 2008; Rezende *et al.*, 2009).

A criação de animais domésticos pode atrair vetores, e esses por sua vez podem picar os humanos (Patz *et al.*, 2000). As áreas muito povoadas sem saneamento básico e condições adequadas podem atrair roedores para o peridomicílio; esses roedores por sua vez, podem atrair vetores que podem se adaptar e estabelecer um ciclo peridoméstico de transmissão de doenças, podendo até gerar um surto devido à alta densidade populacional (Patz *et al.*, 2000).

Os assentamentos rurais são uma das principais causas do desmatamento. A taxa de derrubada nos assentamentos (1,8% ao ano) é até quatro vezes maior que a taxa média dos desmatamentos na Amazônia Legal (Brandão Jr e Souza Jr, 2006).

O presente estudo teve como objetivo a análise dos efeitos do desmatamento e o aumento da densidade populacional humana em uma área pontual de assentamento rural, fenômenos que têm sido implicados na geração de mudanças epidemiológicas na Amazônia e em outras regiões tropicais (Tadei *et al.*, 1998; Confalonieri, 2000; Desjeux, 2001). Diferentes sistemas patogênicos (conjuntos patógeno-vetor-hospedeiro) podem responder de formas diferentes às mesmas transformações da paisagem (Walsh *et al.*, 1993; Patz *et al.*, 2000). Isto pode gerar, por exemplo, diferenças na distribuição espacial do risco de infecção humana (e.g., diferentes taxas de prevalência em diferentes setores da paisagem) e diferenças na variação temporal do risco (e.g., mudanças nas taxas de incidência em paisagens submetidas a modificações). Neste estudo pretendeu-se observar se ocorrem variações na diversidade da fauna flebotomínica em uma paisagem amazônica com diferentes níveis de modificações e

aspectos da variação espacial da ocorrência de vetores e a sua abundância, e taxas de infecção natural por *Leishmania* sp.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Identificar as associações entre desmatamento, densidade populacional humana e composição faunística de flebotomíneos.

2.2 Específicos

- Determinar se existe uma variação na abundância e diversidade de espécies de flebotomíneos entre as quatro categorias de unidades domiciliares (UD) do assentamento Rio Pardo:

(G1) UDs com alta densidade populacional humana e baixa cobertura florestal

(G2) UDs com baixa densidade populacional humana e baixa cobertura florestal

(G3) UDs com alta densidade populacional humana e alta cobertura florestal

(G4) UDs com baixa densidade populacional humana e alta cobertura florestal

- Determinar se existe uma variação na abundância e diversidade de espécies de flebotomíneos entre os ambientes peridomiciliares (pomar, capoeira) e florestados (floresta e borda de floresta).
- Estimar a taxa de infecção natural em *N. umbratilis* e *B. flaviscutellata* por *Leishmania sp.* na área de estudo.

3. HIPÓTESE

A abundância e diversidade de flebotomíneos variam entre as categorias de UDs com diferentes perfis de desmatamento e densidade populacional humana, e que esta variação espacial pode ter influências de magnitude variável de risco de LTA.

A taxa de derrubada de áreas de floresta foi estimada em aproximadamente 150 ha/ano (1996-2002), enquanto a taxa de expansão das terras de uso agrícola ou comunitário foi, no mesmo período, de aproximadamente 220 ha/ano (Vilela, 2003).

A estrutura física do assentamento inclui seis ramais não pavimentados, uma parte dos lotes localizam-se ao longo das margens do igarapé principal, que aparece na base cartográfica da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM, Serviço Geológico do Brasil, Ministério de Minas e Energia) sob a denominação de 'Rio Canoas'. A micro-região de Rio Pardo está assentada sobre o Complexo Anauá, composto majoritariamente por rochas metamórficas; formações sedimentares recentes aparecem nas margens do Rio Canoas-Pardo (CPRM, 1998). Os solos predominantes são latossolos amarelos distróficos, pouco aptos para a agricultura (Vilela, 2003), mas solos de melhor qualidade (como a 'terra preta') aparecem em algumas sub-áreas (CPRM, 1998). As águas do Rio Canoas-Pardo são barrentas, enquanto os tributários locais são, na sua grande maioria, igarapés de águas claras ou pretas.

As principais atividades econômicas na comunidade de Rio Pardo são a agricultura e pecuária de pequeno porte e o extrativismo vegetal (madeiras, castanha, ervas medicinais) e animal (pesca e caça) (Vilela, 2003; Agum *et al.*, 2008).

Dados do Censo de População de Rio Pardo realizado pela equipe do Instituto Leônidas & Maria Deane (ILMD) mostram que 158 lotes estão permanentemente ocupados por um total de 583 habitantes. A atenção básica de saúde está sob a responsabilidade de agentes comunitários e de uma equipe médica do município que atende quinzenalmente no único posto de saúde (agentes do estado) e técnicos do Departamento Municipal de Controle de Endemias (secretaria municipal de saúde de Presidente Figueiredo) mantêm diariamente o serviço de diagnóstico e tratamento da malária na comunidade. Trimestralmente, os mesmos técnicos aplicam inseticidas nos peridomicílios e, se autorizado pelos moradores, no interior das casas.



Figura 2. Assentamento agrícola de Rio Pardo; em amarelo as áreas desmatadas, em verde as área com cobertura vegetal preservada, as linhas vermelhas indicam os ramais e os triângulos representam as moradias. Fonte: Sylvain Desmoulière



Figura 3. A-E: Tipos de moradias em Rio Pardo, (F) base permanente de pesquisa do Instituto Leônidas & Maria Deane. Fonte: Felipe A.C. Pessoa

4.2 Desenho Amostral

As informações sobre desmatamento e densidade populacional humana, foram derivadas de três fontes de informação: uma imagem de satélite de alta resolução (IKONOS®, 1 m x 1 m, agosto 2008). Dados detalhados sobre cada UD coletados sistematicamente através de entrevistas (CONEP 384/07) e pesquisa de campo e o desmatamento foi considerado como a porcentagem de área sem cobertura florestal em cada UD.

O desmatamento foi manualmente delineado na imagem de satélite (IKONOS®, 1 m x 1 m, agosto 2008) e a taxa de desmatamento foi calculada pelo programa PRODES (INPE 2000) apresentando variação de 0 a 99%. A densidade populacional humana para cada UD foi estimada como a soma do número de habitantes permanentes da UD e o número de habitantes de outras UDs localizadas a menos de 300 m de distância apresentando variação de 0 a 63 moradores. Em situações onde áreas de UDs diferentes se sobrepuseram apenas uma foi considerada e a uma nova área foi sorteada (Figura 4).

Estas informações sintetizam os padrões de desmatamento e o perfil demográfico de cada UD, e assim foram usadas para definir quatro grandes categorias de UDs:

- (G1) alta densidade populacional e baixa cobertura florestal;
- (G2) baixa densidade populacional e baixa cobertura florestal;
- (G3) alta densidade populacional e alta cobertura florestal;
- (G4) baixa densidade populacional e alta cobertura florestal.

Todos os dados (imagens de satélites, dados temáticos espaciais e dados coletados na área de estudo) foram georeferenciados em um ambiente de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) usando o software ARCGIS 9.2. O ambiente de SIG foi utilizado para extrair variáveis espaciais por inspeção direta e digitalização manual de elementos chave da paisagem (floresta, casas, rios, lagos, estradas etc.) reconhecíveis na imagem IKONOS®.

Foram escolhidos, de forma aleatória, 24 pontos amostrais (seis UDs de cada um dos quatro grupos pré-definidos) amostrados em seis coletas, três durante estação chuvosa e três durante estação seca, de modo que todos os pontos foram amostrados seis vezes ao longo do projeto, sendo cada ponto analisado uma vez por viagem.

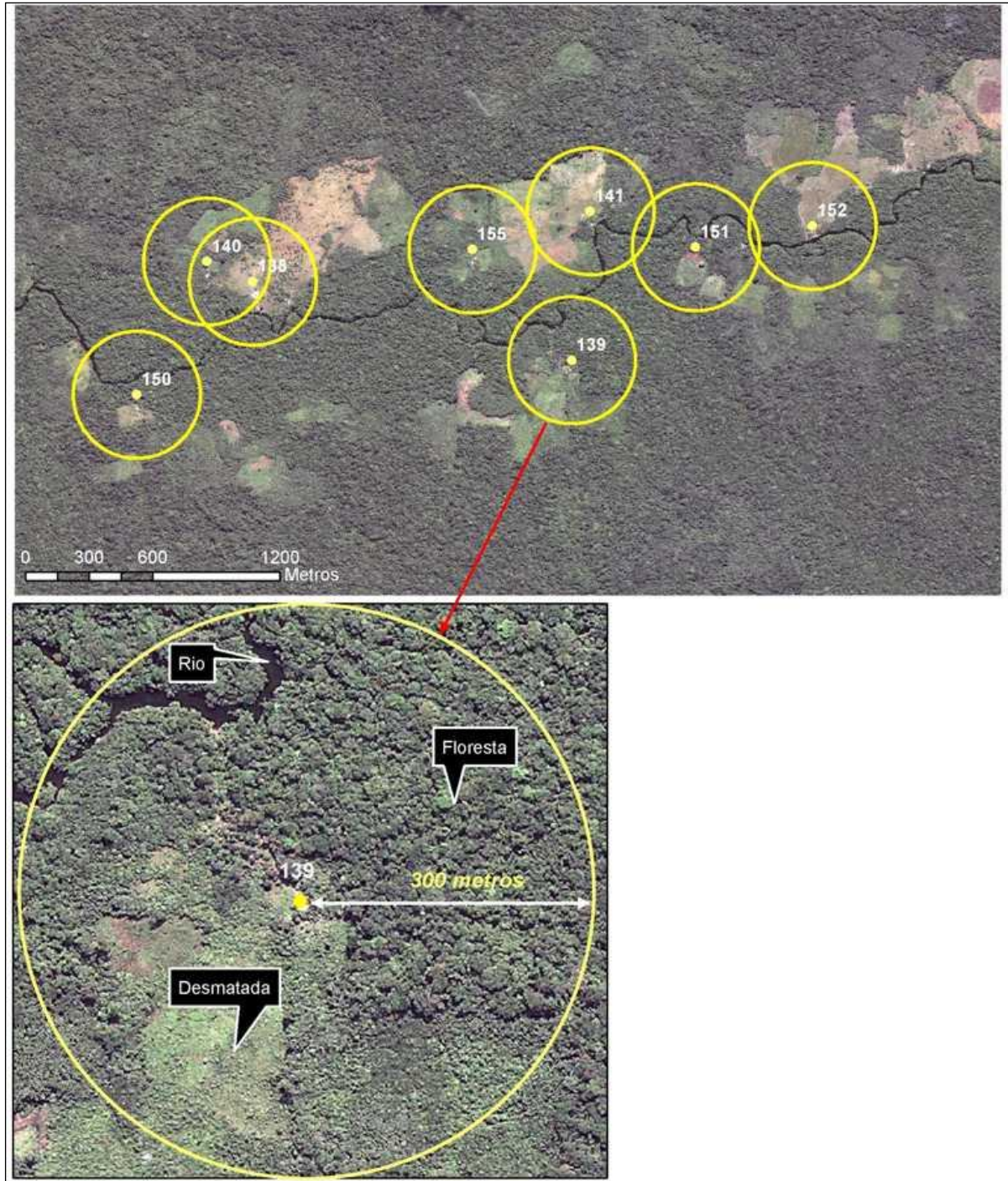


Figura 4- Ilustração do procedimento de seleção de UD's em função de suas características ambientais básicas (desmatamento e densidade populacional humana) na comunidade de Rio Pardo. Cada residência foi identificada por um código numérico; a UD é definida como a residência e a área de 300 m de raio ao redor dela (círculos amarelos). Fonte: Sylvain Desmoulière.

4.3 Dados entomológicos

As coletas de flebotomíneos foram feitas por meio de armadilhas luminosas do tipo CDC colocadas a 1,5m de altura do chão; foram colocadas cinco armadilhas em cada UD por coleta durante um período de 12 horas (18:00 às 06:00) totalizando 30 armadilhas / dia. As armadilhas foram colocadas em cinco ambientes diferenciados em cada UD até o raio de 300m: capoeira, pomar, borda de mata, mata e peridomicílio (quando neste havia abrigos animais a armadilha era colocada dentro do abrigo). As UDs que não apresentavam os cinco ambientes tinham as armadilhas espalhadas especialmente no peridomicílio.

Após a coleta, o material recolhido foi levado até o laboratório base, no Assentamento, em caixas de isopor contendo algodão umedecido; o material das gaiolas foi triado e os flebotomíneos foram conservados em álcool comercial 96% até a identificação dos indivíduos e análise molecular.

Posteriormente a triagem, os indivíduos machos foram diafanizados utilizando Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% , em seguida lavados em água ultrapura e após em solução de ácido acético a 10% por dois minutos e montados inteiros entre lâmina e lamínula contendo fluido de Berlese; as fêmeas foram previamente dissecadas, a cabeça e a genitália foram diafanizadas também utilizando KOH a 10%, lavadas com ácido acético a 10% e montadas dorso-ventralmente em lâminas de berlese. As fêmeas identificadas como *N. umbratilis* e *B. flaviscutellata* tiveram o abdome e tórax armazenados em álcool 70% para análise de infecção natural por leishmânias. Os flebotomíneos foram identificados morfológicamente através da observação de genitália (machos e fêmeas) e cibário (fêmeas) por meio de chaves propostas por Young & Duncan (1994) e Galati (2003), sendo adotada a classificação para gênero proposta por Galati (2003).

4.4 Padronização do protocolo para o diagnóstico molecular na detecção da infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* spp.

A estratégia utilizada, de uma forma geral, nos diagnósticos moleculares de agentes etiológicos em vetores é a construção de grupos (*pools*) de insetos da mesma espécie. Essa estratégia visa aliar a diminuição de esforços, recursos financeiros e também a possibilidade de examinar um maior número de amostras dos insetos.

Diversos estudos utilizam essa estratégia com simulídeos para detecção de onconcerose (Rodríguez-Perez *et al.*, 1999; Marchon-Silva *et al.*, 2007); em anofelinos para detecção de malária (Moreno *et al.*, 2004; Póvoa *et al.*, 2006), em culicíneos para detecção de dengue, filariose e arboviroses (Goodman *et al.*, 2003; Plichart *et al.*, 2006; Zeidler *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2010; Pauvolid-Côrrea *et al.*, 2010) e também em flebotomíneos para detecção de leishmaniose (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006; Neitzke *et al.*, 2008; Pita-Pereira *et al.*, 2011).

Assim, estabelecemos uma série de experimentos com o objetivo de padronização do protocolo e testando a sensibilidade do método utilizado.

4.4.1. Extração de DNA

Para todos os experimentos abaixo descritos utilizamos o mesmo método.

Cada amostra foi macerada com ajuda de pistilos em 80µL de PBS a 1%, após foram adicionados 20 µL de Proteinase K e permaneceram em banho Maria a 56°C por oito horas. Em seguida foram seguidos os passos segundo o protocolo do kit de extração DNA (DNeasy® Blood and Tissue Kit: DNeasy Mini Spin Colunas- Qiagen) conforme figura 5.

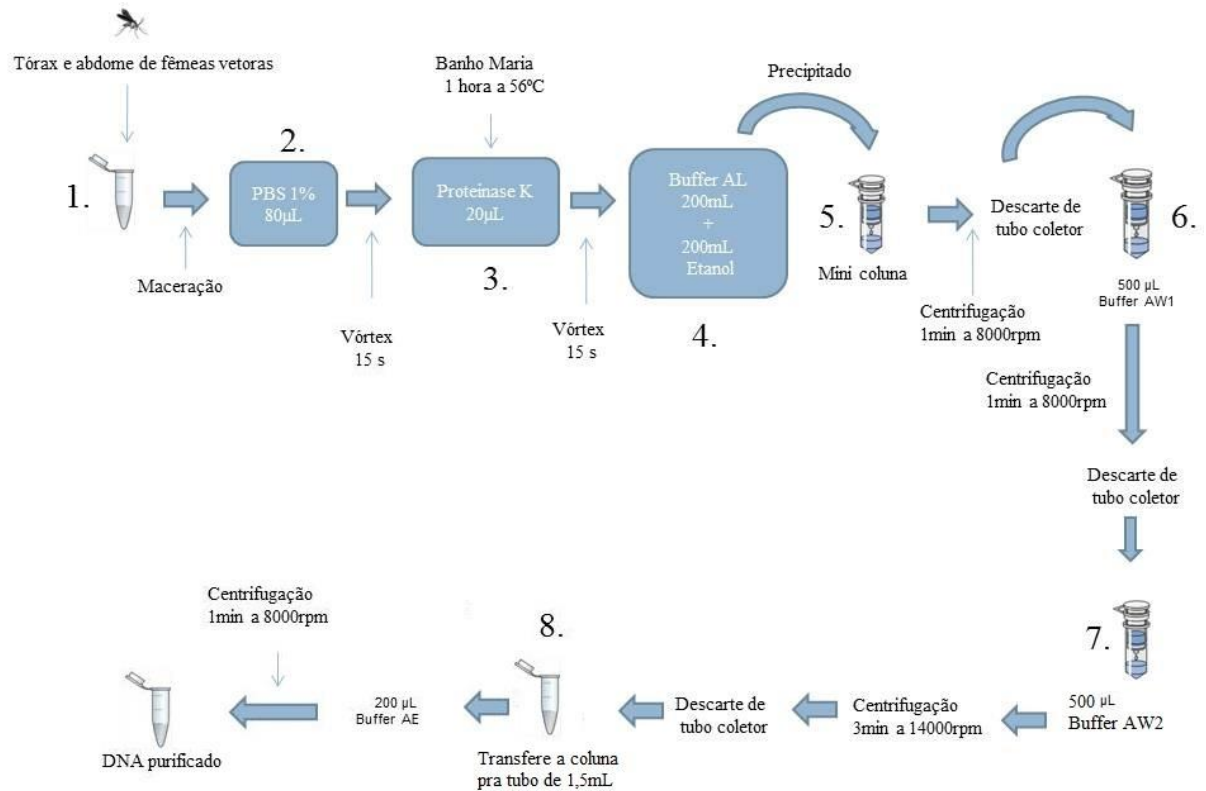


Figura 5. Protocolo de Extração de DNA (DNeasy® Blood and Tissue Kit: DNeasy Mini Spin Colunas- Qiagen): 1. Maceração de tórax e abdome de fêmeas das espécies vetoras individualmente; 2. Adição de 80µL de PBS e centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm (6000xg); 3. Incubação da amostra a 56°C após adição de 20 µL de Proteinase K; 4. Após vórtex foi adicionado 200mL de Buffer AL (Fornecido no kit) e 200mL de etanol a 100%; 5. A amostra sofreu vórtex de 15 segundos e o precipitado foi transferido para uma mini coluna e sofreu centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm (6000xg); 6. Após a centrifugação, o tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor onde foi adicionado 500µL de Buffer AW1 e a amostra foi novamente centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm (6000xg); 7. Depois da centrifugação o tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para novo tubo coletor onde foi adicionado 500µL de Buffer AW2 e a amostra foi centrifugada por 3 minutos a 14000 rpm (20000xg); 8. Após centrifugação, o tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um microtubo do tipo eppendorf de 1,5 mL onde foi adicionado 200 µL de Buffer AE e a amostra sofreu centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm (6000xg).

4.4.2. Construção de controles

4.4.2.1 Controles negativos

Foram utilizados *pools* 1, 5, 10, 15 e 20 machos de *Migonemyia migonei* (França) oriundos de colônia de laboratório.

Foi realizada a extração de DNA seguindo o método descrito acima nas amostras e o material foi preservado para ser utilizado nas reações de verificação de infectividade.

4.4.2.2 Controles positivos

Foram utilizados *pools* contendo machos de *Migonemyia migonei* oriundos de colônia de laboratório e fêmeas de *Nyssomyia umbratilis*, capturadas na AM 174 previamente dissecadas e com infecção natural detectada. Os *pools* foram formados da seguinte maneira:

1i – 1 fêmea de *N. umbratilis* infectada;

2i – 1 fêmea de *N. umbratilis* infectada e 4 machos de *M. migonei*;

3i – 1 fêmea de *N. umbratilis* infectada e 9 machos de *M. migonei*;

4i – 1 fêmea de *N. umbratilis* infectada e 14 machos de *M. migonei*; e

5i – 1 fêmea de *N. umbratilis* infectada e 19 machos de *M. migonei*.

Foi realizada a extração de DNA dos *pools* e as amostras obtidas foram submetidas a uma reação de PCR, com o objetivo de verificar a detecção do DNA de leishmania, utilizando os primers (Tammam *et al.* 2008):

JM-U-0011-L-62 (Universal): 5'-caa gtc tgg tgc cag cac-3'

JM-T-0012-R-62 – (tripanosomatídeos): 5'- ccg aac tac cct cct tca ttc-3'

As reações seguiram:

O mix da reação foi preparado com as seguintes concentrações: 2,5 mL de Buffer (1X), 1,0 mL de MgCl₂ (2mM), 0,5 mL de dNTPs (0.2mM), 1,25 mL de cada *primer* (0.5 µL), 0,25 mL de Taq Polimerase (1,25U), 2 mL do DNA de cada amostra e 16,25 mL de H₂O ultrapura, totalizando um volume final de 25 mL.

Foram ainda construídos controles positivos para Leishmânia (K4, k5 e k6) utilizando 18 mL de controle negativo (machos de *Migonemyia migonei* colônia de laboratório) juntamente com 2,0 ml de DNA de leishmania de cultura (Amostra RAPD20) diluído a 10^{-1} . Também foram construídos controles de *Megatrypanum sp.* obtidos através de dissecação de fêmeas de campo.

4.4.3 Condições das reações

A amplificação do DNA foi realizada utilizando um termociclador (Gene Amp® PCR System 9700) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 65°C por 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C por 40 segundos (extensão da fita), e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram revelados em gel de agarose a 1%, com uso de TAE 1X e 2µL/100mL de Brometo de etídeo. Foram aplicados no gel 25 µL de cada amostra juntamente com 4 µL de *loading buffer* 5uL e 10 µL de controle/branco. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb, conforme instrução do fabricante. A eletroforese foi programada a 240V por uma hora e 15 minutos, após esse tempo, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado no sistema Lpix Image Ex (Loccus Biotecnologia).

4.4.4. Testes das amostras dos flebotomíneos das coletas:

As amostras das coletas totalizaram 50 indivíduos. Assim, desse modo, foram realizadas extrações de DNA de flebotomíneos individuais e reações para verificação da infecção individuais.

4.4.4.1. Confirmação da extração de DNA:

Inicialmente, antes de seguir para a reação de verificação de infecção nos flebotomíneos as amostras foram submetidas a uma reação de PCR, com o objetivo de verificar a qualidade da extração do DNA, utilizando os *primers* específicos para um gene específico de invertebrados o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) (Folmer *et al.*, 1994):

LCO1490: 5'-ggtaacaaatcataaagatattgg-3' e

HC02198: 5'-taaacttcagggtgaccaaataatca-3'.

As reações seguiram:

O mix da reação foi preparado com as seguintes concentrações: 2,5 mL de Buffer *minus* Mg (1X), 0,25 mL de MgCl₂ (2mM), 0,5 mL de dNTPs (0.2mM), 1 mL de cada *primer* (0.4 µL), 0,5 µL de Taq Polimerase (5U), 5 µL do DNA de cada amostra e 14,25 mL de H₂O ultrapura, totalizando um volume final de 25 mL.

4.4.4.2 Condições da reação:

A amplificação do DNA foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 45°C por 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C por 2 minutos (extensão da fita), e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram revelados em gel de agarose a 1%, com uso de TAE 1X e 2µL/100mL de Brometo de etídeo. Foram aplicados no gel 25 µL de cada amostra juntamente com 4 µL de *loading buffer* 5uL e 10 µL de controle/branco. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb, conforme instrução do fabricante. A eletroforese foi programada a 240V por uma hora e 15 minutos, após esse tempo, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema Lpix Image Ex (Loccus Biotecnologia).

4.4.4.3. Teste de infecção natural:

As amostras foram testadas individualmente. Foram acrescentados os controles negativos K1 e k2 e os controles positivos 1i, 2i, k5 e k6.

A amplificação do DNA foi realizada utilizando um termociclador (Gene Amp® PCR System 9700) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 65°C por 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C por 40 segundos (extensão da fita), e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram revelados em gel de agarose a 1%, com uso de TAE 1X e 2µL/100mL de Brometo de etídeo. Foram aplicados no gel 25 µL de cada amostra juntamente com 4 µL de *loading buffer* 5uL e 10 µL de controle/branco. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb, conforme instrução do fabricante. A eletroforese foi programada a 240V

por uma hora e 15 minutos, após esse tempo, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado no sistema Lpix Image Ex (Loccus Biotecnologia).

4.5. Análise dos dados

Os dados coletados foram submetidos inicialmente à análise descritiva e encontram-se disponibilizados com seus valores absolutos e relativos tabulados no formato de tabelas e gráficos, com auxílio do programa Microsoft® Excel 2007 para WINDOWS.

A comparação da abundância de flebotomíneos entre as categorias de UD's foi realizada através de dois testes, Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e a posteriori o teste de Student-Newman-Keuls. O mesmo procedimento foi adotado na comparação entre os habitats capoeira, pomar, borda de mata, mata e peridomicílio (Ayres *et al.*, 2000).

Tanto entre categorias de UD's como nos ambientes o índice de Shannon & Wiener foi utilizado para a estimativa de diversidade de espécies (H') e o índice de similaridade de Jaccard (J') para a estimativa da similaridade de flebotomíneos. Também foi utilizado o índice de Equitabilidade de Pielou (J') que permite representar a uniformidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies existentes (Magurran, 2005). Curvas de rarefação foram utilizadas para estimar e comparar tanto a riqueza de espécies como a densidade (DP) de flebotomíneos entre as categorias de UD's. Nesse caso a DP corresponde ao número observado de espécies em cada UD (Gotelli e Colwell, 2001).

O índice de diversidade de Shannon (H') reflete dois atributos básicos: o número e a equitabilidade de espécies, demonstrando que quanto maior o valor de H' , maior a diversidade da área em estudo; o Índice de equitabilidade de Pielou (J') permite representar a uniformidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies existentes e seu valor apresenta uma amplitude de 0 (uniformidade mínima) a 1 (uniformidade máxima); e o Índice de Jaccard (CCj) compara qualitativamente a semelhança entre espécies ao longo de um gradiente ambiental (Magurran, 2005).

Todas as análises foram realizadas nos seguintes programas: Systat 8.0, BioEstat 5.0 e Past.

Tabela 1. Fórmulas dos índices de diversidade, equitabilidade e similaridade utilizados no estudo.

Índice	Denominação	Fórmula
Diversidade	Índice de Shannon (H')	$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \cdot \ln \frac{n_i}{N}$
Equitabilidade	Índice de Pielou (J')	$J' = \frac{H'}{H_{max}}, \text{ em que } H_{max} = \ln(S)$
Similaridade	Índice de Jaccard (CCJ)	$CCJ = \frac{c}{a + b - c}$

Onde: S = número total de espécies amostradas; N = número total de indivíduos amostrados; n_i = número de indivíduos amostrados para a i-ésima espécie; Ln = logaritmo neperiano; a = número de espécies do ambiente A; b = número de espécies do ambiente B; c = número de espécies comuns em A e B.

5. RESULTADOS

5.1 - Abundância geral de flebotomíneos

Foram capturados 3.073 indivíduos, sendo 1.163 fêmeas (37,8%) e 1.910 machos (62,2%) identificados em 13 gêneros e 53 espécies (Apêndice A). Os gêneros mais abundantes foram: *Nyssomyia* (Barreto) distribuído com seis espécies representando 1.628 indivíduos (53% do total); *Psychodopygus* (Mangabeira) com sete espécies e 307 indivíduos (10% do total); *Evandromyia* (Mangabeira) com oito espécies e 285 indivíduos (9,2% do total). Por outro lado, os gêneros menos representativos foram *Lutzomyia* (França) com quatro espécies e apenas sete indivíduos (0,23%) e *Trichopygomyia* (Barreto) com uma espécie e 10 indivíduos (0,33%).

As espécies mais abundantes foram *N. antunesi* com 1.025 indivíduos (33,0%) seguidas por *N. umbratilis* com 448 indivíduos (14,5%), *Micropygomyia rorotaensis* com 194 (6,3%) e *Trichophoromyia ubiquitalis* com 164 (5,3%). As outras espécies ocorreram em menor abundância, representando cada uma menos de 5,0%, e juntas somaram 41,4% do total. Algumas espécies só apresentaram apenas um indivíduo capturado em todo período amostral: *L. flabellata*, *L. chassigneti*, *L. gomezi*, *L. sherlocki*, *N. richardwardi*, *N. yuliyulli*, *Psathyromyia abonnenci*, *Sciopemyia pennyi* e *Trichophoromyia gibba*.

Dentre as espécies capturadas no presente estudo, cinco são incriminadas como vetoras: *N. antunesi* (1.025 indivíduos) vetora de *Leishmania (Viannia) lindenberg*, *N. umbratilis* (448) vetora de *L. (V.) guyanensis*, *Trichophoromyia ubiquitalis* (164), *Psychodopygus amazonensis* (82) e *Bichromomyia flaviscutellata* (76) vetoras respectivamente de *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania)amazonensis*;

5.2 Categorias de UDs

5.2.1 - Abundância de espécies de flebotomíneos por UDs

Em relação às categorias de UDs (Apêndice B), G3 (alta densidade humana e uma alta cobertura) apresentou a maior quantidade de indivíduos capturados (1.031) representando 42 espécies capturadas, com um maior número de indivíduos especialmente nos ambientes de floresta (404 indivíduos) e no peridomicílio (326 indivíduos); e as espécies mais abundantes foram *N. antunesi* (243 indivíduos) seguida de *N. umbratilis* (201 indivíduos). O grupo G1 (alta densidade humana e baixo padrão de desmatamento) foi o segundo tanto em abundância de indivíduos com 719 indivíduos como em número de espécies (39), principalmente nos ambientes de peridomicílio (437 indivíduos) e floresta (192), sendo as espécies mais representativas *N. antunesi* (381 indivíduos) e *N. umbratilis* (47 indivíduos). As categorias G4 (baixa densidade humana e alta cobertura vegetal) e G2 (Densidade humana baixa e baixa cobertura vegetal) apresentaram respectivamente 590 e 493 indivíduos distribuídos em 28 e 37 espécies, com maior número de flebotomíneos capturados nos ambientes de peridomicílio (184) no grupo G4 e floresta (319) no G2. Na categoria G4 as espécies mais representativas foram *N. antunesi* (348 indivíduos) e *T. ubiquitous* (67 indivíduos), enquanto na categoria G2 *N. umbratilis* (118 indivíduos) foi a espécie em maior abundância seguido de *N. antunesi* (74). Embora o número de indivíduos coletados na categoria G3 tenha sido maior que nas categorias 1, 2 e 4, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($H = 4,10$ gl 3 $P = 0,249$) (Apêndice B).

Em todas as categorias observadas a maioria das espécies foi representada com uma frequência de ocorrência menor que cinco indivíduos (G1= 47,5%; G2= 51,35%; G3= 30,23%; G4= 66,6%) (Figura 6). Poucas espécies apresentaram frequência acima de 25 indivíduos, e particularmente na classe acima de 50 indivíduos só foram encontradas exclusivamente as espécies *N. antunesi* em todas as categorias (G1, G2, G3 e G4), *N. umbratilis* em três (G1, G2, G3) e *M. rorotaensis* em apenas uma (G3).

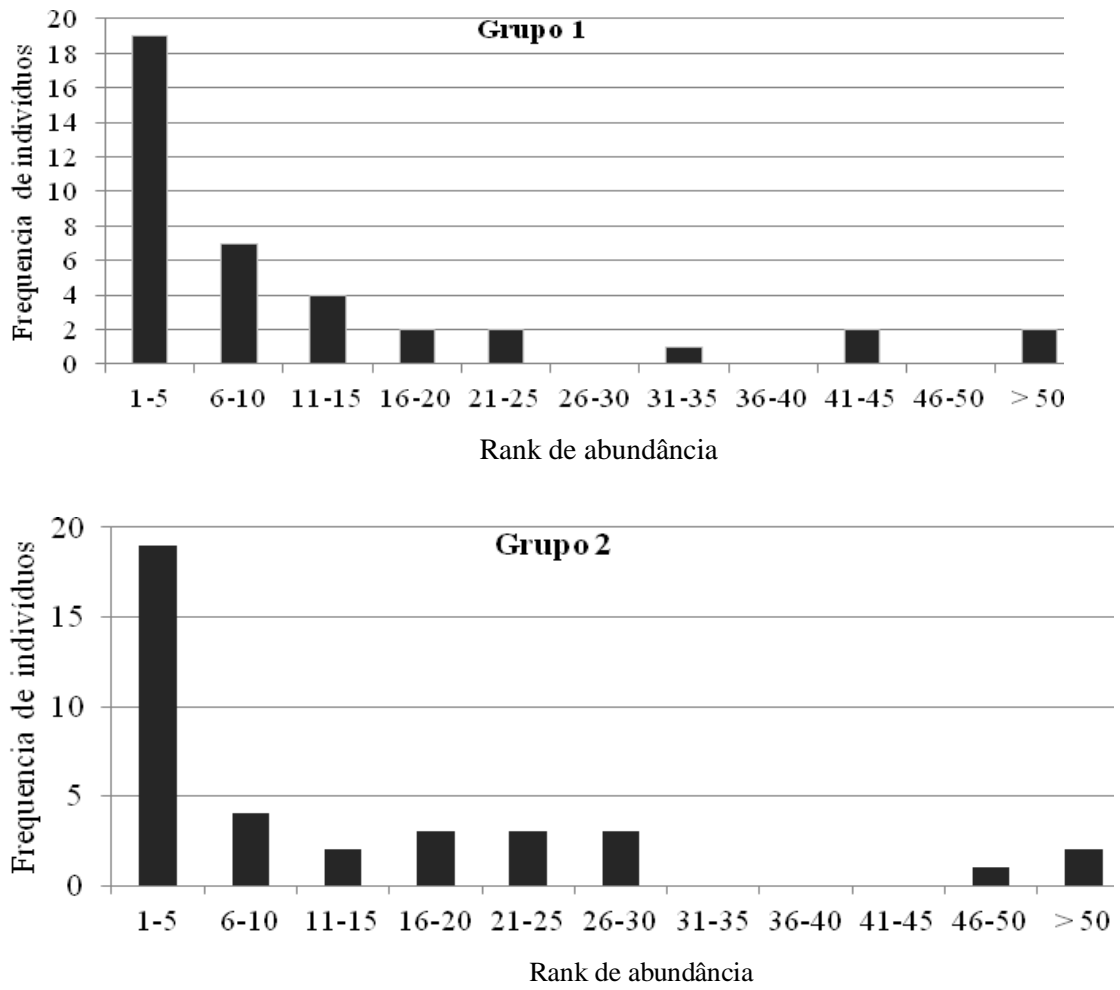


Figura 6 – Rank de abundância de indivíduos amostrados nos grupos G1 e G2 em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

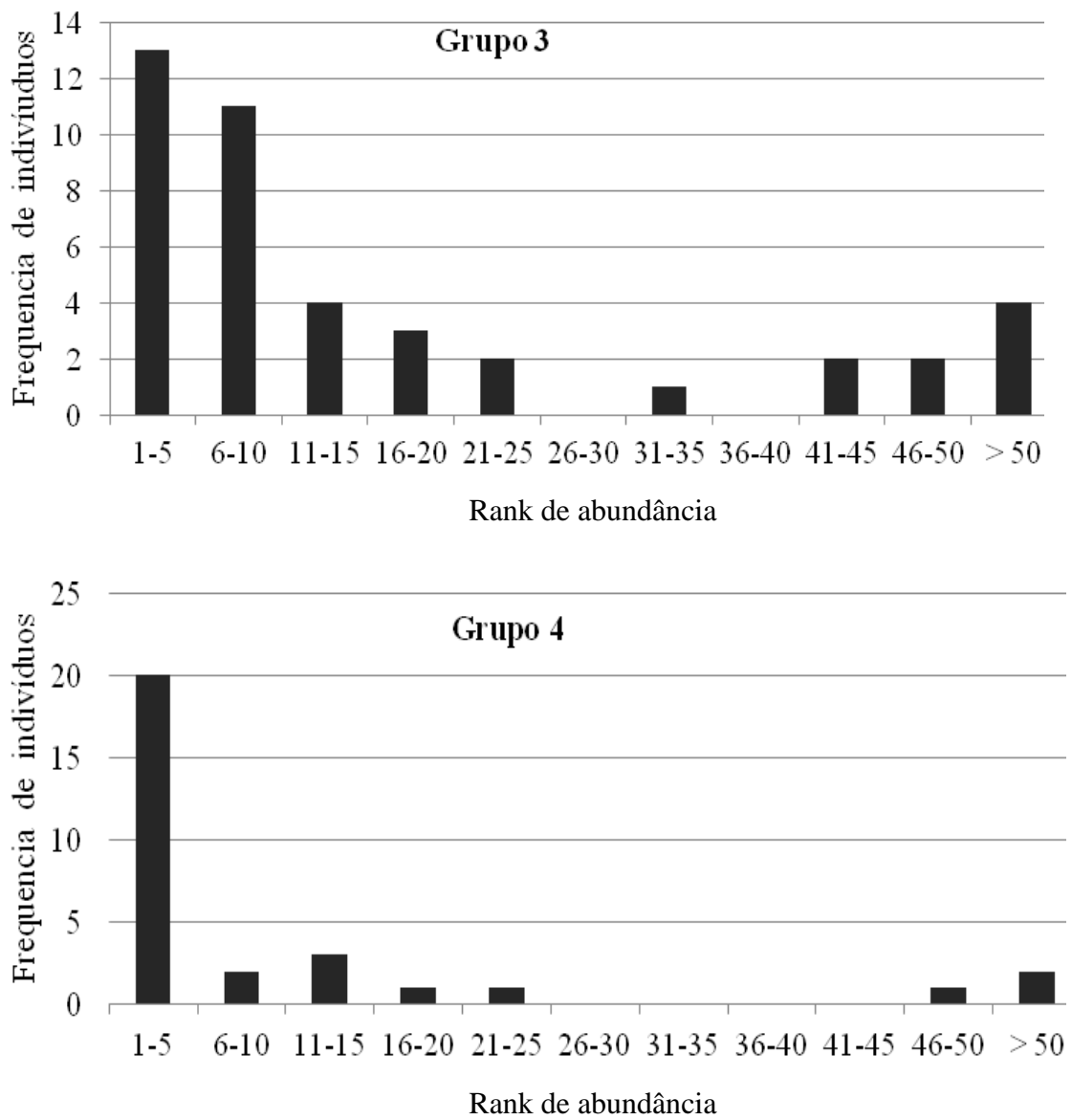


Figura 6. Rank de abundância de indivíduos amostrados nos grupos G3 e G4 em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

5. 2. 2. Diversidade, equitabilidade, similaridade e riqueza de espécies de flebotomíneos por categoria de UD's

A riqueza variou entre 30 a 43 espécies, entre as categorias de ambientes avaliados, porém a abundância dos indivíduos variou de forma expressiva, com valores nos intervalos entre 586 a 1.136. Os reflexos deste são captados pelos índices de diversidade de Shannon, os quais variaram entre 0,75 a 1,20 e pela equitabilidade de Pielou, ocorrendo entre os intervalos de 0,51 a 0,75. O índice de diversidade foi maior em locais de maior concentração populacional e que apresentaram uma maior cobertura florestal, como na categoria de ambiente G3 (Alta densidade populacional humana e alta cobertura floresta), já a mais baixa diversidade foi detectada no ambiente G4. Ao analisar todos os valores dos índices de diversidade, observou-se o seguinte gradiente entre as categorias, expresso em ordem crescente de diversidade pelo índice de Shannon: $G4 < G1 < G2 < G3$ (Tabela 4).

A equitabilidade da categoria G4 ($J'=0,51$) foi a mais baixa se comparada principalmente com as categorias G2 e G3 ($J'=0,75$ e $J'=0,73$ respectivamente) (Tabela 4).

As similaridades nas categorias, na sua maioria apresentaram-se muito próximas, variando entre 62% a 75%. A partir dos resultados, nota-se que as categorias G1/G2 foram mais similares entre si, sendo as categorias G4/G1 as que apresentaram menor grau de similaridade (Figura 7).

De acordo com a rarefação a riqueza observada de espécies nas categorias G1, G2 e G3 foi relativamente próxima, sendo ligeiramente maior na categoria G3 (Tabela 4, Figura 8) e a densidade de espécies estimada foi maior na categoria G3 ($DE = 43$). Entre as curvas de rarefação, apenas uma apresentou-se quase estabilizada (G3), indicando que teoricamente todas as espécies possíveis de serem registradas pelo método utilizado, foram capturadas. Para as categorias (G1, G2 e G4), não foi observado que as espécies apresentaram uma tendência a estabilização, e não atingiram a assíntota, indicando que possivelmente não foram encontradas todas as espécies que ocorrem nesses ambientes.

Tabela 2 - Número de amostras (N), número de eventos (n), total de indivíduos (TI), índice de Shannon & Wiener (H') e equitabilidade de Pielou (J') por categorias de UDs, obtidos no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

Categorias	N	N	TI	H'	J	S obs	S esp
G1	30	4	758	0,99	0,62	40	37,4 ($\pm 1,3$)
G2	30	4	594	1,18	0,75	37	36,6 ($\pm 0,57$)
G3	30	4	1136	1,20	0,73	43	38,3 ($\pm 1,65$)
G4	30	4	586	0,75	0,51	31	29,7 ($\pm 0,5$)

S obs = Espécies observadas, S esp = Espécies esperadas; G1 = Alta densidade populacional humana e baixa cobertura florestal
 G2 = Baixa densidade populacional humana e baixa cobertura florestal; G3 = Alta densidade populacional humana e alta cobertura florestal
 G4 = Baixa densidade populacional humana e baixa cobertura florestal

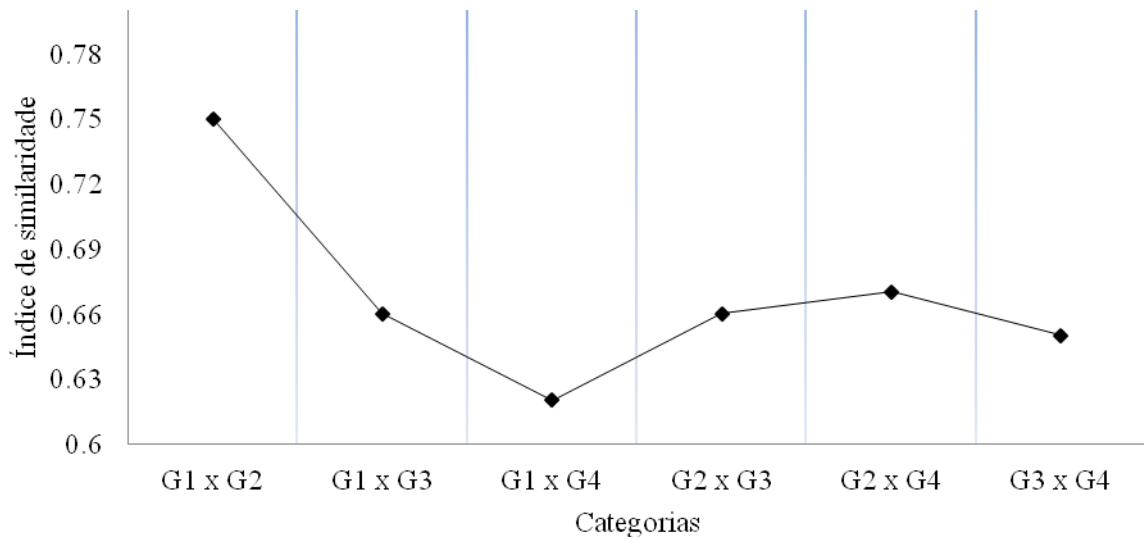


Figura 7 – Índices de similaridade (Jaccard) entre as categorias amostradas G1, G2, G3 e G4, em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

G1 = Alta densidade populacional humana e baixa cobertura floresta
 G2 = Baixa densidade populacional humana e baixa cobertura floresta
 G3 = Alta densidade populacional humana e alta cobertura floresta
 G4 = Baixa densidade populacional humana e baixa cobertura floresta

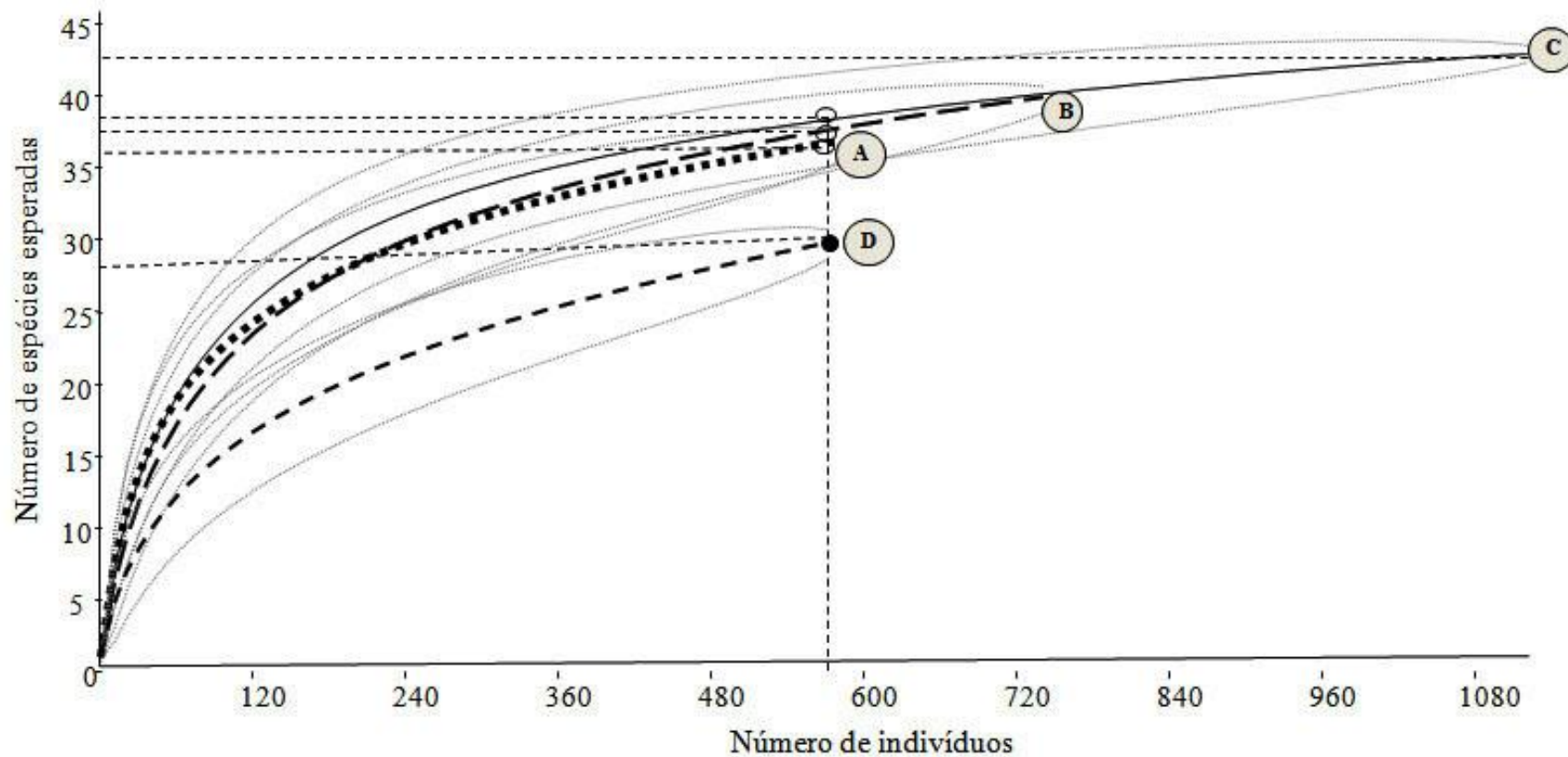


Figura 8 - Curvas de rarefação representando a riqueza cumulativa das espécies nas quatro categorias de Uds em Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas. A riqueza de espécies (número estimado de espécies em cada UD dado pela igualdade de tamanhos de amostra) foi rarefado a partir do número de indivíduos nas UDs considerando a menor abundância de flebotomíneos (●). Círculos fechado e aberto (●, ○) indicam riqueza de espécies e as letras indicam a densidade de espécies (A, B, C) (ver Tabela 3). A riqueza de espécies e os valores de densidade são o mesmo em D (●). A curva central, representadas por linhas pontilhada e não pontilhadas de cor preta, corresponde a média das curvas geradas com a ordem aleatória de amostras de cada UD; as curvas em cinza representam o desvio padrão associado a cada ponto da curva. Categoria G1 = B; Categoria G2 = A; Categoria G3 = C; Categoria G4 = D.

5.3 – Ambientes

5.3.1 - Abundância de flebotomíneos

No geral foram identificados por ambiente (floresta, peridomicílio, borda, pomar e capoeira) um total de 2.859 indivíduos (Tabela 5), com um maior número de flebotomíneos capturados no peridomicílio (1.295 indivíduos) especialmente em abrigos de animais domésticos como galinheiro e chiqueiro; o segundo ambiente com maior número de flebotomíneos capturados foi a floresta (960). Esses dois ambientes apresentaram um número de flebotomíneos expressivo com diferença estatística significativa ($H= 40,14$, $gl = 4$ $p < 0,0001$) em relação à borda da floresta (435), pomar (124) e capoeira (45). Com aplicação do teste de Student-Newman-Keuls para a comparação estatística entre grupos dois a dois, observou-se diferença significativa entre floresta e os ambientes de borda, capoeira e pomar, o mesmo observado entre o peridomicílio e os ambientes de borda, capoeira e pomar (Figura 9).

Em relação à abundância das espécies por ambientes, observou-se que tanto em floresta como em borda a espécie mais abundante foi *N. umbratilis* com 201 (20,94%) e 108 (24,83%) indivíduos. As espécies *N. antunesi* com 119 (12,40%) e *M. rototaensis* com 119 (9,66%) indivíduos apresentaram-se como a segunda mais abundante nesses ambientes. Já no peridomicílio, *N. antunesi* foi predominante com 864 indivíduos, representando 66,72% do total coletado nesse ambiente seguida por *T. ubiquitalis* com 104 indivíduos (8,03%). Nos ambiente de capoeira e pomar, que apresentaram o menor número de indivíduos capturados, as espécies mais abundantes foram *M. rorotaensis* (16 indivíduos – 35,56%) e *T. ubiquitalis* (16 indivíduos – 12,90%) respectivamente (Tabela 5).

Tabela 3 - Espécies de flebotomíneos e suas devidas proporções capturadas por ambientes (Floresta, Borda, Peridomicílio, Capoeira e Pomar) no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

Espécies	Ambientes										Total
	Floresta	%	Borda	%	Peri	%	Capoeira	%	Pomar	%	
<i>Bumptomys brumpti</i>	6	0,63	2	0,46	3	0,23	2	4,44	0	0,00	13
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	46	4,79	17	3,91	9	0,69	0	0,00	2	1,61	74
<i>Bichromomyia olmeca nociva</i>	6	0,63	3	0,69	9	0,69	0	0,00	0	0,00	18
<i>Bichromomyia reducta</i>	7	0,73	1	0,23	3	0,23	0	0,00	0	0,00	11
<i>Evandromyia inpai</i>	21	2,19	2	0,46	1	0,08	0	0,00	0	0,00	24
<i>Evandromyia monstrosa</i>	37	3,85	5	1,15	1	0,08	0	0,00	0	0,00	43
<i>Evandromyia pinotti</i>	4	0,42	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	5
<i>Evandromyia saulensis</i>	1	0,10	2	0,46	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3
<i>Evandromyia sericea</i>	6	0,63	4	0,92	5	0,39	0	0,00	1	0,81	16
<i>Evandromyia sordelli</i>	17	1,77	4	0,92	15	1,16	1	2,22	12	9,68	49
<i>Evandromyia walkeri</i>	31	3,23	9	2,07	73	5,64	3	6,67	8	6,45	124
<i>Evandromyia williamsi</i>	1	0,10	2	0,46	0	0,00	0	0,00	2	1,61	5
<i>Lutzomyia flabelata</i>	1	0,10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Lutzomyia baityi</i>	0	0,00	0	0,00	2	0,15	0	0,00	0	0,00	2
<i>Lutzomyia chassigneti</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1
<i>Lutzomyia gomezi</i>	0	0,00	1	0,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	1	0,10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Micropygomyia micropyga</i>	12	1,25	2	0,46	14	1,08	2	4,44	9	7,26	39
<i>Micropygomyia pilosa</i>	2	0,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	62	6,46	42	9,66	50	3,86	16	35,56	8	6,45	178
<i>Nyssomyia anduzei</i>	72	7,50	33	7,59	23	1,78	3	6,67	1	0,81	132
<i>Nyssomyia antunesi</i>	119	12,40	32	7,36	864	66,72	4	8,89	9	7,26	1028
<i>Nyssomyia shawi</i>	1	0,10	2	0,46	0	0,00	0	0,00	1	0,81	4
<i>Nyssomyia umbratilis</i>	201	20,94	108	24,83	38	2,93	6	13,33	12	9,68	365
<i>Nyssomyia yulli yulli</i>	0	0,00	2	0,46	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Pressatia choti</i>	17	1,77	5	1,15	1	0,08	0	0,00	0	0,00	23
<i>Pressatia triachanta</i>	2	0,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Pressatia trispinosa</i>	18	1,88	1	0,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00	19
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	16	1,67	4	0,92	5	0,39	0	0,00	4	3,23	29
<i>Psathyromyia campbelli*</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1
<i>Psathyromyia cuzcuena</i>	0	0,00	2	0,46	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	7	0,73	2	0,46	12	0,93	0	0,00	2	1,61	23
<i>Psathyromyia inflata</i>	1	0,10	1	0,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Psathyromyia lutziana</i>	2	0,21	4	0,92	0	0,00	0	0,00	1	0,81	7
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i>	16	1,67	2	0,46	3	0,23	0	0,00	2	1,61	23
<i>Psathyromyia scaffii</i>	3	0,31	4	0,92	2	0,15	0	0,00	1	0,81	10
<i>Psychodopygus amazonenses</i>	45	4,69	24	5,52	4	0,31	0	0,00	5	4,03	78

Espécies	Ambientes										Total
	Floresta	%	Borda	%	Peri	%	Capoeira	%	Pomar	%	
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	5	0,52	2	0,46	0	0,00	0	0,00	1	0,81	8
<i>Psychodopygus chagasi</i>	14	1,46	13	2,99	4	0,31	0	0,00	9	7,26	40
<i>Psychodopygys clausurei</i>	41	4,27	5	1,15	0	0,00	0	0,00	1	0,81	47
<i>Psychodopygus davisi</i>	33	3,44	37	8,51	1	0,08	0	0,00	4	3,23	75
<i>Psychodopygus hirsuta</i>	0	0,00	2	0,46	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Psychodopygus squamiventris squamiventris</i>	3	0,31	8	1,84	5	0,39	0	0,00	0	0,00	16
<i>Sciopemyia nematoducta</i>	18	1,88	9	2,07	9	0,69	1	2,22	1	0,81	38
<i>Sciopemyia pennyi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	2,22	0	0,00	1
<i>Trichophoromyia eurypyga</i>	39	4,06	17	3,91	20	1,54	2	4,44	11	8,87	89
<i>Trichophoromyia gibba</i>	1	0,10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	15	1,56	16	3,68	104	8,03	3	6,67	16	12,90	154
<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	5	0,52	1	0,23	1	0,08	1	2,22	1	0,81	9
<i>Viannamyia furcata</i>	5	0,52	1	0,23	9	0,69	0	0,00	0	0,00	15
<i>Viannamyia tuberculata</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	1
Total	960		435		1295		45		124		2859

Peri= Peridomicílio

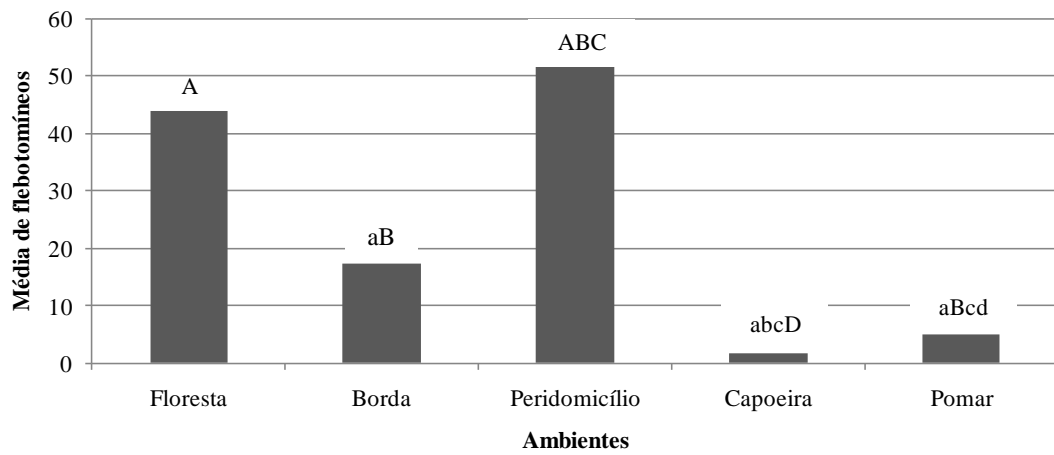


Figura 9 – Abundância de flebotomíneos nos ambientes de floresta, borda, peridomicílio, capoeira e pomar, coletados no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, 2009 - 2010. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, segundo o teste de Kruskal – Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.3.2 Diversidade, equitabilidade, similaridade e riqueza de espécies de flebotomíneos

O número de espécies variou de 13 a 42 entre os ambientes. Foi encontrado um maior número de espécies no ambiente de floresta, seguido pelo ambiente de borda e peridomicílio; enquanto pomar e capoeira tiveram um menor número de espécies (Tabela 6).

A diversidade de espécies em cada tipo de paisagem mostrou que o ambiente de floresta apresentou uma maior diversidade ($H' = 1,28$), seguidos pelo ambiente de borda ($H' = 1,23$) enquanto o menor índice foi observado no ambiente de peridomicílio ($H' = 0,65$) (Tabela 6). Por outro lado, a equitabilidade estimada pelo índice de Pielou foi maior nos ambientes de borda ($J' = 1,20$) e Capoeira ($J' = 0,83$) e o menor no ambiente de peridomicílio ($J' = 0,42$). (Tabela 6).

A semelhança das espécies de flebotomíneos foi maior nos ambientes floresta e borda (72%) e floresta e peridomicílio (61%) e o menor índice de similaridade entre espécies de flebotomíneos foi observado entre floresta e capoeira e borda e capoeira (28%) (Figura 10).

Tabela 4 - Número de amostras (N), número de eventos (n), total de indivíduos (TI), Índice de Shannon & Wiener (H') e equitabilidade de Pielou (J') por ambientes (Floresta, Borda, Peridomicílio, Capoeira e Pomar), obtidos no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

Ambientes	N	n	TI	H'	J'	S obs
Floresta	24	5	971	1,28	0,79	42
Borda	24	5	419	1,23	0,76	41
Peridomicílio	24	5	1281	0,65	0,42	34
Capoeira	24	5	42	0,93	0,83	13
Pomar	24	5	120	1,20	0,87	25

S obs = Espécies observadas.

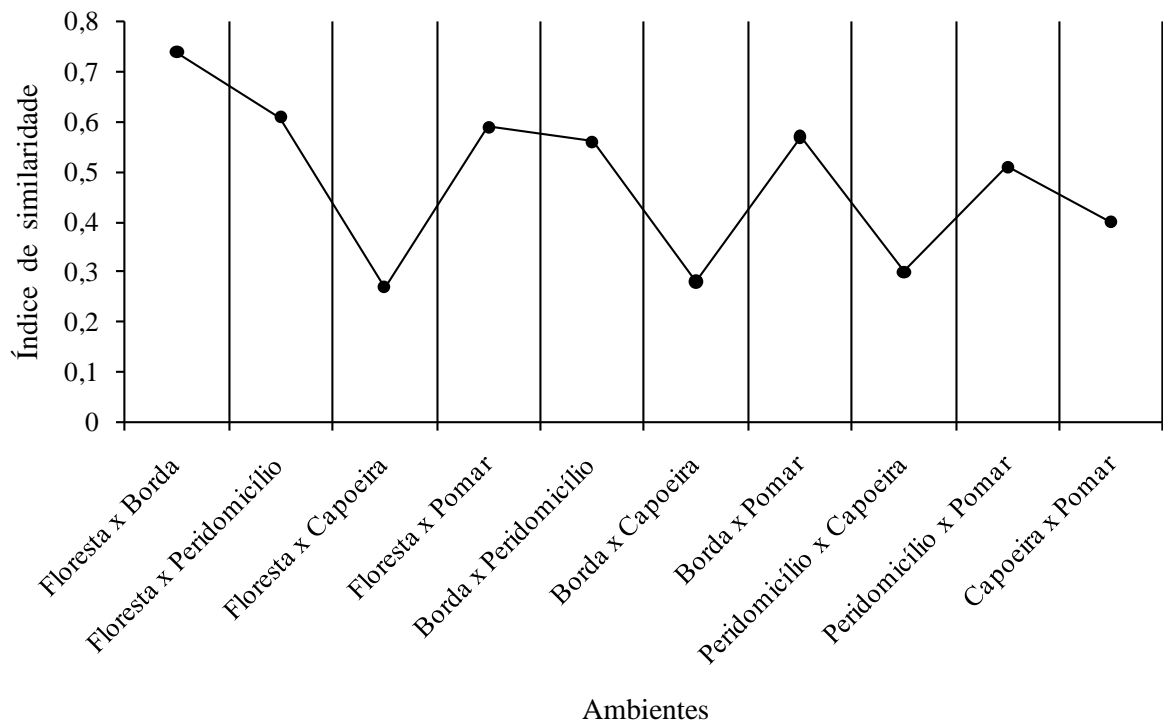


Figura 10 – Índices de similaridade (Jaccard) entre os ambientes de floresta, borda, peridomicílio, capoeira e pomar, no assentamento Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, 2009 - 2010.

5.4 – Vetores

Dos 3.073 flebotomíneos capturados, 1.741 (56,65%) de cinco espécies são vetores de *Leishmania* no Brasil: *N. antunesi* (59,96%), *N. umbratilis* (21,59%), *T. ubiquitous* (9,41%), *P. amazonenses* (4,76%), *B. flaviscutelata* (4,25%). Foram capturados um maior número de indivíduos machos 1278 (73,40%) em relação à quantidade de fêmeas com 463 (26,60%). A análise da relação sexual mostrou que os machos foram mais prevalentes do que as fêmeas em todas as espécies (Tabela 7).

Em relação à abundância por categoria (UDs), foi capturado um maior número de flebotomíneos na G3 (535 indivíduos), seguido pela G1 (486 indivíduos) e o menor número nas categorias G4 (454 indivíduos) e G2 (266 indivíduos). Não foi observada diferença estatística significativa entre as categorias de Uds ($H = 2,62$ gl 3 $P = 0,45$).

Considerando somente as espécies mais abundantes, foi observado que *N. antunesi* foi capturado em maior número na categoria G1 (379 indivíduos) e em menor na categoria G2 (73 indivíduos) não ocorrendo diferença estatística significativa ($H = 1,66$ gl 3 $P = 0,644$), já *N. umbratilis* apresentou maior abundância na categoria G3 (195 indivíduos) e a menor na G4 (20 indivíduos) e não houve do mesmo modo diferença estatística entre as categorias amostradas ($H = 4,21$ gl 3 $P = 0,239$).

Em relação aos ambientes, as espécies *B. flaviscutelata*, *P. amazonensis* e *N. umbratilis* foram mais abundantes no ambiente de floresta e borda, enquanto que *N. antunesi* e *T. ubiquitous* foram mais abundantes no peridomicílio (Figura 11a, 11b, 11c, 11d, 11e). O teste de Kruskal–Wallis mostrou a existência de diferença estatística significativa na abundância de flebotomíneos entre os ambientes para as espécies mais abundantes, *N. antunesi* e *N. umbratilis*: *Nyssomyia antunesi* foi capturada em maior abundância no peridomicílio (863 indivíduos) ($H = 16,84$ gl = 4 $p < 0,001$) em relação a floresta (119 indivíduos), borda (31), capoeira (4) e pomar (8); O teste a posteriori, Student-Neumann-Keulls, identificou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ambientes de floresta em relação a capoeira e pomar, e entre o peridomicílio em relação a capoeira e pomar (Figura 11d). *Nyssomyia umbratilis* foi mais abundante na floresta (200 indivíduos) ($H = 20,17$ gl 4 $p = 0,0005$) em relação a borda (105), peridomicílio (33), capoeira (6) e pomar (11); o teste a posteriori testou ambientes dois a dois e identificou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes ambientes: floresta em relação a pomar e a capoeira, Borda em relação a capoeira e ao pomar (Figura 11e).

Tabela 5 – Espécies de flebotomíneos que transmitem leishmaniose no Brasil, coletados no assentamento rio Pardo, Município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil.

Espécies	G1		G2		G3		G4		Total			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂/♀	♂/♀
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i>	16	5	14	13	5	9	6	6	41	33	74	1,2
<i>Nyssomyia antunesi</i>	344	35	63	10	194	50	314	34	915	129	1044	7,1
<i>Nyssomyia umbratilis</i>	1	45	56	59	73	122	5	15	135	241	376	0,6
<i>Psychodopygus amazonenses</i>	5	2	7	18	34	10	3	4	49	34	83	1,4
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	23	10	23	3	33	5	59	8	138	26	164	5,3
Total	389	97	163	103	339	196	387	67	1278	463	1741	2,8

♂: Machos; ♀: Fêmeas; ♂/♀: Razão sexual

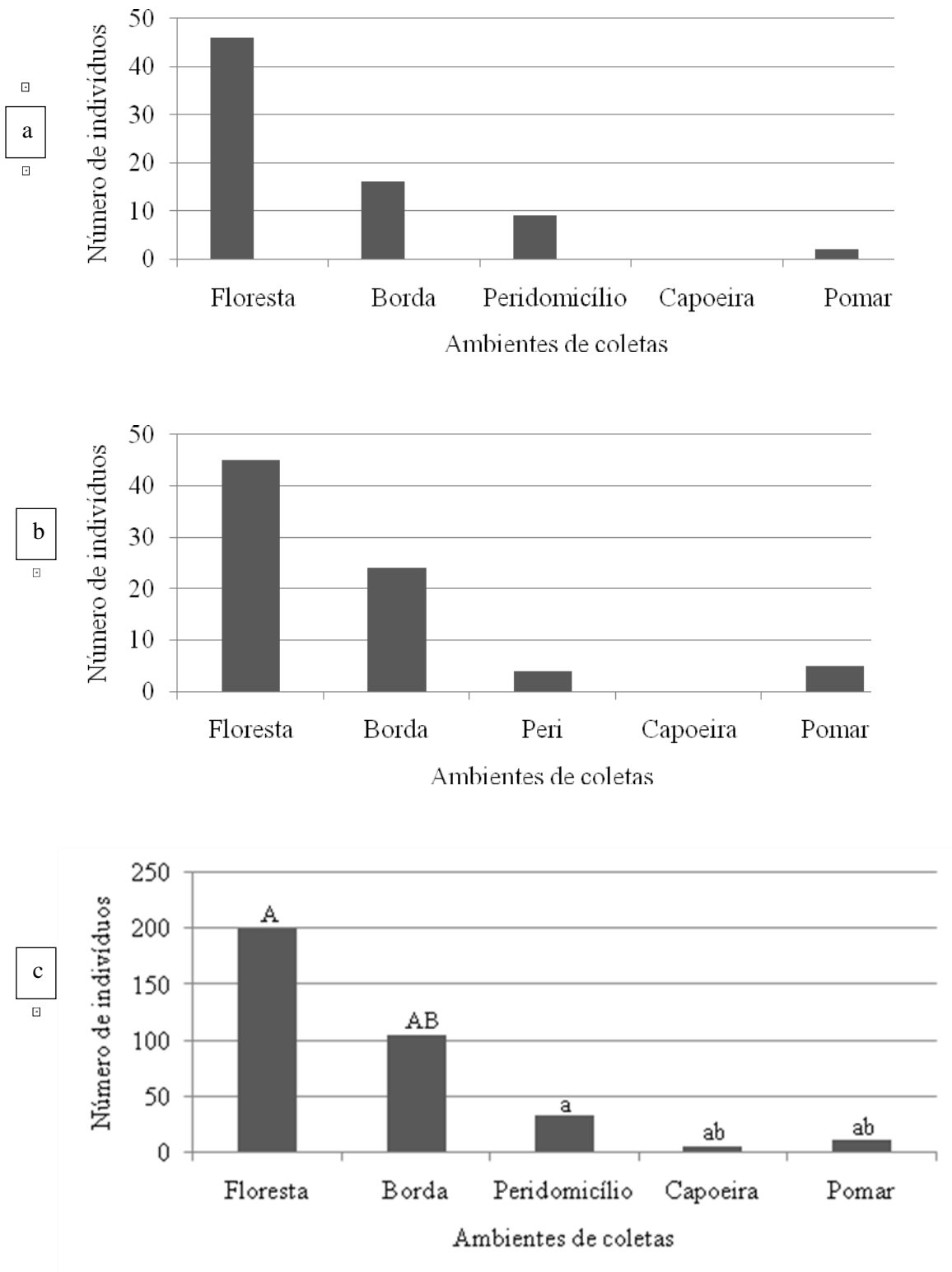


Figura 11 – Abundância das espécies de flebotomíneos vetoras de leishmanioses por ambientes (a): *Bichromomyia flaviscutelata*, (b): *Psychodopygus amazonensis*, (c): *Nyssomyia umbratilis* coletados em rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, após um Kruskal – Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

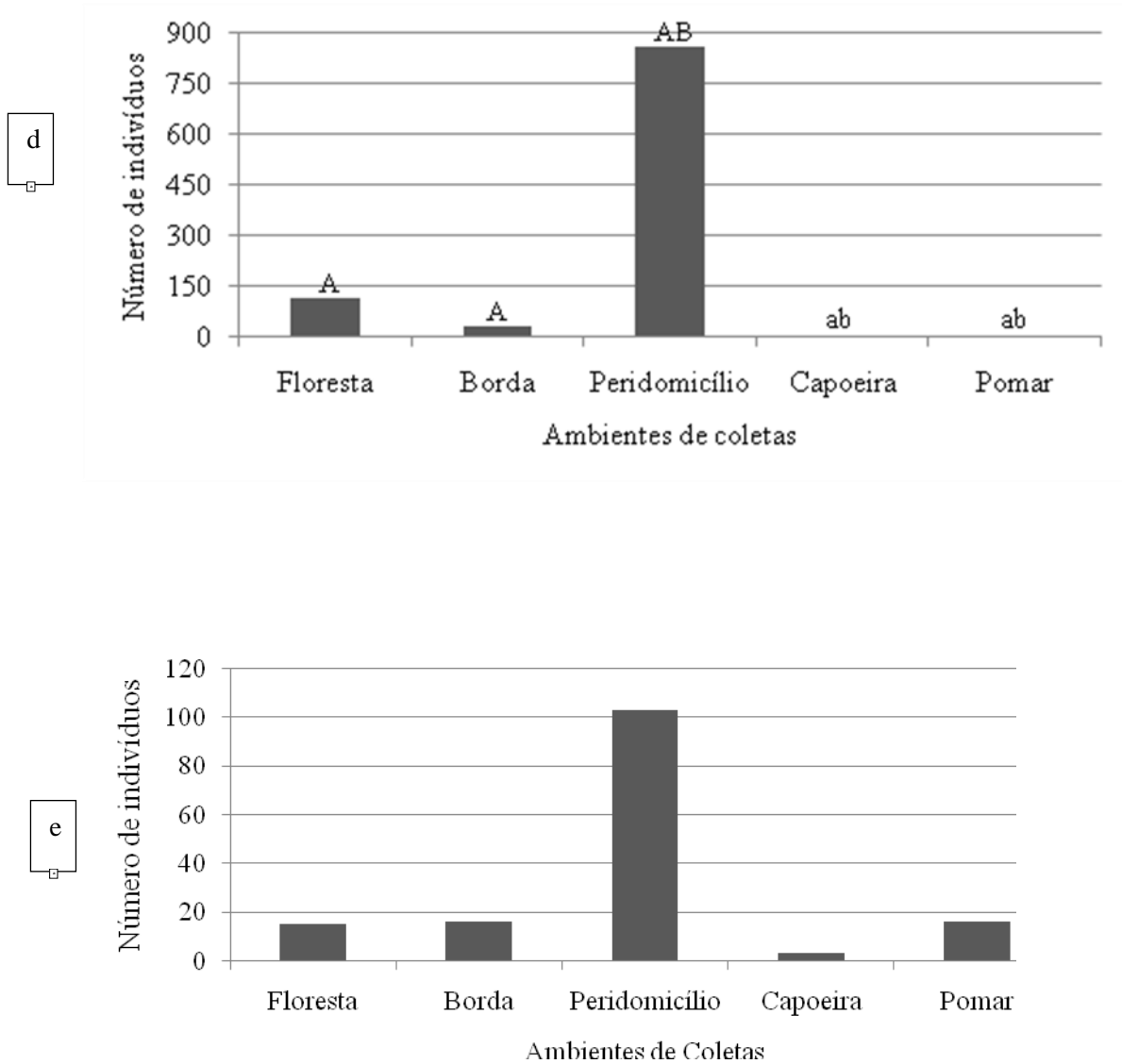


Figura 11 (Continuação) – Abundância das espécies de flebotomíneos vetoras de leishmanioses por ambientes (d): *Nyssomyia antunesi*, (e): *Trichophoromyia ubiquitalis*, coletados em rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Barras com letra diferente apresentam diferença significativa, após um Kruskal – Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.5. Taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. em vetores

5.5.1. Construção de controles

- a. Controles positivos: Após a visualização do gel de eletroforese foi observado um melhor resultado nos *pools* formados por uma fêmea infectada (1i), e uma fêmea infectada e 4 machos de *M. migonei* (2i) (Figura 12) . Foram utilizados os controles 1i e 2i para verificação de infecção nas amostras, juntamente com os controles K4, k5 e k6 construídos apartir de machos de *M. migonei* e DNA de Leishmânia diluído a 10^{-1} .

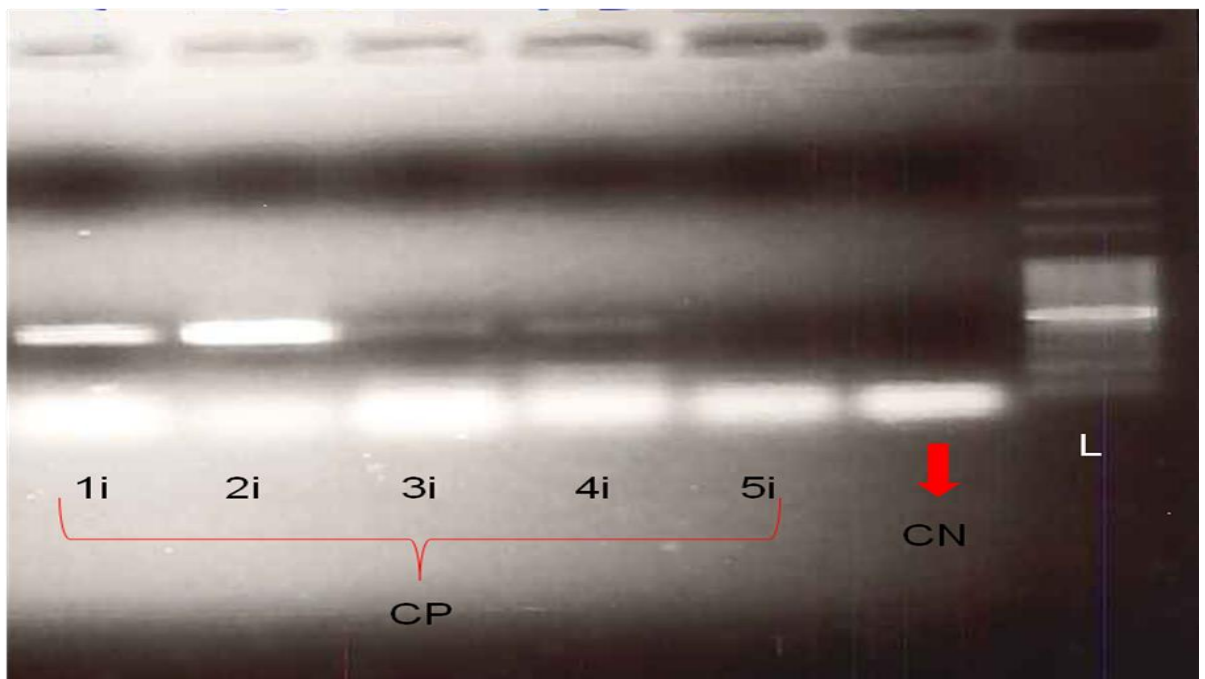


Figura 12– Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA ladder 100 pb (L) dos controles positivos (CP) contendo fêmeas de *N. umbratilis* infectadas naturalmente e machos de *M. migonei* oriundos de colônias de laboratório. Controles positivos: 1i (1 fêmea infectada), 2i (1 fêmea infectada e 4 machos), 3i (1 fêmea infectada e 9 machos), 4i (1 fêmea infectada e 14 machos) e 5i (1 fêmea infectada e 19 machos); Controle negativo (CN): pools de machos de *M. migonei*.

5.5.2. Testes das amostras dos flebotomíneos das coletas:

a. Confirmação da extração de DNA:

Foi realizada a análise molecular através de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em 50 indivíduos fêmeas de flebotomíneos, sendo, seis de *B. flaviscutellata* e 44 de *N. umbratilis*.

Trinta e sete amostras foram positivas para Citocromo Oxidase I e 13 não mostraram banda. Apesar das amostras negativas, o DNA foi extraído de forma eficaz na maioria das amostras (Figura 13).

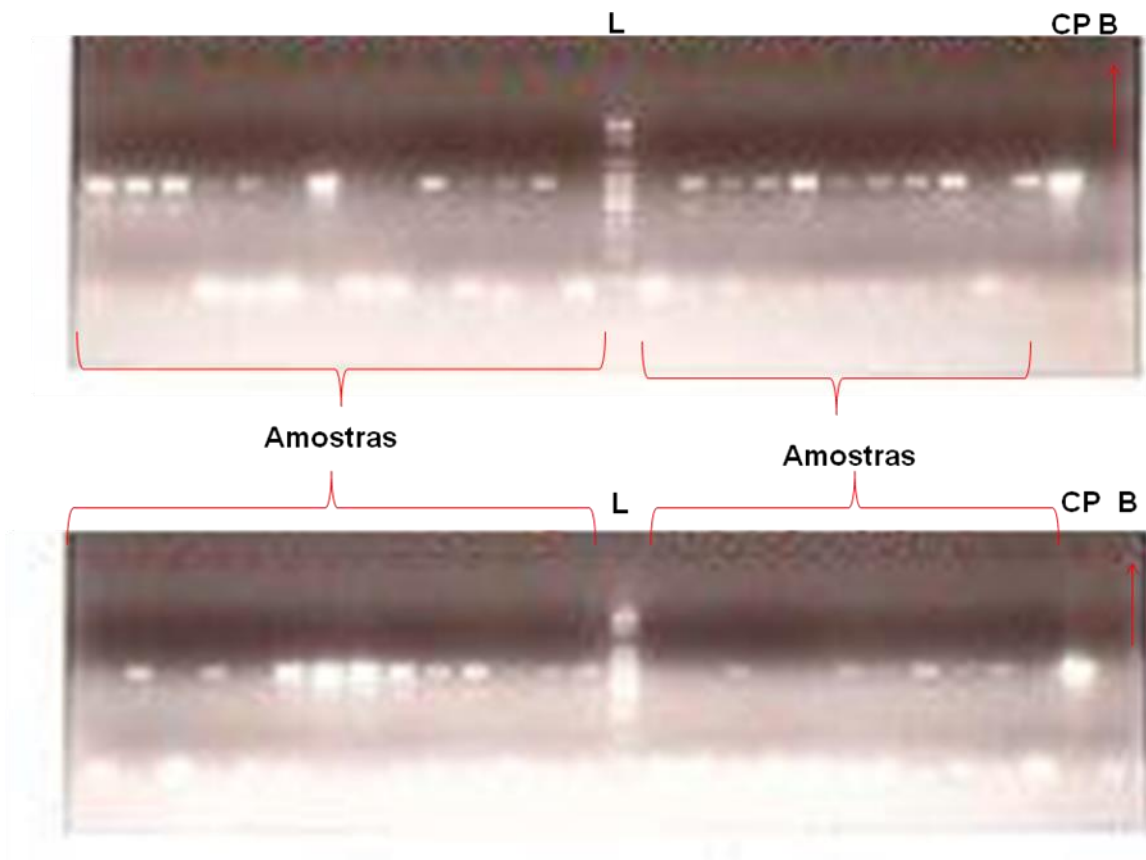


Figura 13. PCR usando *primers* específicos para Citocromo Oxidase I. Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA *ladder* 100 pb (L) das amostras de *N. umbratilis* e *B. flaviscutellata* oriundas do Assentamento de Rio Pardo juntamente com os controles positivos (CP) (DNA de machos de *M. migonei*) e branco (B).

b. Teste de infecção natural

Para verificação da infecção natural por Leishmânia nas amostras, a PCR foi feita em triplicata simultaneamente utilizando *primers* específicos para tripanossomatídeos, porém, não foi verificada amplificação em nenhuma das amostras conforme a figura 14.

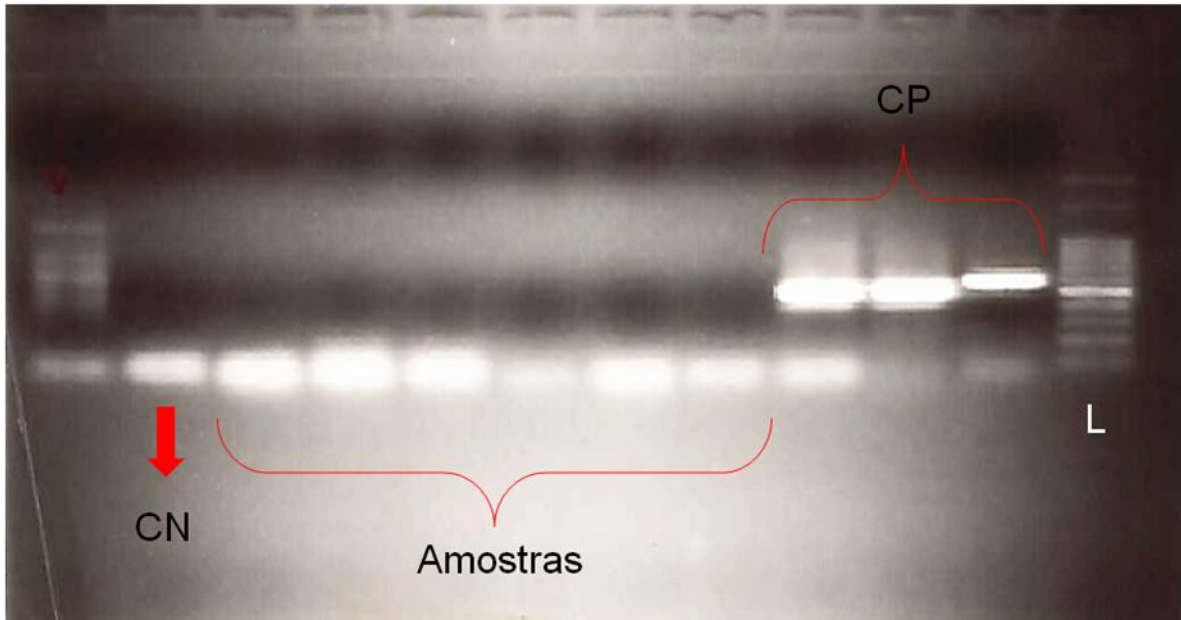


Figura 14. PCR usando *primers* específicos para tripanossomatídeos. Eletroforese de gel de agarose a 1%. DNA *ladder* 100 pb (L) das amostras de *N. umbratilis* e *B.flaviscutellata* oriundas do Assentamento de Rio Pardo juntamente com os controles positivos (CP) e controle negativo (CN)

6. DISCUSSÃO

6. 1. Abundância e diversidade geral

O estado do Amazonas representa 49% da fauna de flebotomíneos existentes no Brasil com 112 espécies registradas até 2009, destas 67 estão presentes em Manaus e municípios próximos (Young e Duncan, 1994; Galati, 2003; Castellon, 2009). Arias e Freitas (1982) registraram 50 espécies na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus ao longo da BR-139. Castellon *et al.*, (1994) capturaram 57 espécies de flebotomíneos e Dias-Lima *et al.* (2002) observaram a presença de 41 espécies em uma área de floresta primária de terra firme, também em Manaus; corroborando com esses resultados no presente estudo foram capturadas 53 espécies de flebotomíneos distribuídas em áreas de floresta, borda de floresta, pomar, capoeira e peridomicílios no Assentamento Rural de Rio Pardo no município de Presidente Figueiredo; portanto, como era esperado a fauna de flebotomíneos de Rio Pardo é tão diversificada quanto a de outros locais do estado (Barrett *et al.*, 1996; Silva & Castellón, 2010, Silva *et al.* 2007, Gomes & Franco, 2011).

Em relação a proporção macho: fêmea, foi observada uma maior abundância de machos em relação às fêmeas, de aproximadamente dois machos para uma fêmea; Oliveira *et al.* (2003) também observaram uma quantidade maior de machos em capturas realizadas no Estado do Mato Grosso. Gama-Neto *et al.* (2010) também observaram uma proporção de machos mais elevada que em fêmeas na Serra do Tepequém no Estado de Roraima, onde dos 2.230 indivíduos capturados, 1.256 eram machos; esses resultados indicaram que os machos possivelmente foram atraídos pelas armadilhas luminosas quando formavam agregados e acompanharam as fêmeas para cópula, ou ainda devido ao fato que flebotomíneos machos emergem antes das fêmeas, é possível que as capturas tenham sido realizadas em locais relativamente próximos a criadouros (Forattini, 1973; Feliciangeli, 1987). Também existem alguns estudos que mostraram resultados diferentes dos encontrados nesse trabalho, onde a proporção de fêmeas foi maior, provavelmente porque existiam numerosas fontes de repasto que atraíam essas fêmeas ou de populações que estejam maduras, em fim de sazonalidade de menor abundância (Rebêlo *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007; Pessoa *et al.* 2007).

6.2. Abundância, diversidade, similaridade e riqueza por categoria de UDs

No presente estudo foram observadas a abundância, diversidade, similaridade e riqueza de espécies de flebotomíneos em quatro diferentes categorias de UDs com padrões de desmatamento e densidade populacional humana diferentes.

A maior abundância e diversidade de espécies foram observadas na categoria de ambientes com alta densidade humana e alta (G3) e na categoria com alta densidade humana e baixo percentual de desmatamento (G1), especialmente no ambiente de floresta e no peridomicílio. Valderrama *et al.*, (2011), estudaram a influência antrópica em três tipos de ambientes com diferentes graus de antropização e seus efeitos na distribuição, abundância e diversidade de espécies vetoras de leishmaniose no Panamá e também observaram uma maior abundância de indivíduos em áreas com maior fragmentação por ação humana. Em Minas Gerais, em um estudo comparativo a fauna de flebotomíneos na margem direita e esquerda do Rio Velhas, Saraiva *et al.* (2008) observaram uma maior diversidade de espécies de flebotomíneos na margem do rio que apresentava uma maior densidade populacional humana. Todos esses resultados indicaram uma tendência adaptativa de várias espécies de flebotomíneos às mudanças causadas no ambiente pela fragmentação de habitat. Resultados semelhantes foram encontrados por Rebêlo *et al.* (2009) que coletaram uma grande quantidade de *L. whitmani*, espécie incriminada como vetora de *L. (V.) braziliensis*, em áreas de peridomicílio em zonas rurais na Amazônia maranhense em abrigos de animais domésticos.

Nesse contexto de mudança do ambiente, observa-se em áreas que foram recém-desmatadas e colonizadas que no geral, não existem condições de saneamento básico, como sistemas de esgoto e coleta de lixo e dessa forma o acúmulo de resíduos orgânicos e entulhos de construções nesses povoados podem atrair roedores e marsupiais para os arredores das casas. Alguns desses animais podem atuar como reservatórios de parasitas e em contato com vetores e humanos e o impacto das mudanças desse ambiente pode desencadear um surto local de doenças infecciosas. Arias e Freitas (1981) observaram a presença de *Didelphis marsupialis* infectados com flagelados na zona urbana de Manaus; Guerra *et al.* (2007), também verificaram a presença dessa mesma espécie com flagelados e lesões suspeitas de leishmaniose em peridomicílios no conjunto habitacional Hiléia em Manaus.

A mudança de ambiente associada a criação de animais domésticos, como galinhas, porcos, cavalos e vacas, no peridomicílio e a instalação de novas moradias, especialmente se as mesmas se encontrarem próximas a fragmentos florestais, podem atrair flebotomíneos; algumas espécies de flebotomos podem se adaptar a essas mudanças, podendo existir em alta densidade nesses locais, devido a abundância de fontes de repasto e locais propícios para criadouros (Campbell-Lebrum *et al.*, 2001); Legriffon *et al.* (2012) verificaram a frequência de espécies de flebotomíneos em uma fazenda no Paraná, e observaram que após a reorganização e limpeza do ambiente peridomiciliar, o número de flebotomos diminuiu no ambientes domiciliares, mostrando a importância das condições peridomiciliares no ciclo de possíveis vetores de doenças. Na área urbana de Bonito, foco de transmissão de leishmaniose visceral canina, verificou-se o predomínio de *L. longipalpis*, sobretudo em ambientes antrópicos com criação de aves e de suínos, como é comum em outros focos urbanos de ocorrência da doença (Lainson e Shaw, 2005). Galati *et al.* (2003) realizaram estudos em um assentamento rural em área de leishmaniose visceral e também apontaram ecótopos de abrigos de animais como pocilgas e galinheiros como amplificadores das condições de manutenção de populações de *L. longipalpis* nos peridomicílios. O fato foi comprovado pela acentuada redução do número de indivíduos coletados, quando houve a troca de lugar e melhoria das condições de limpeza ou de remoção desses ambientes

A maior riqueza de espécies foi observada na categoria (G3) possivelmente devido uma maior cobertura vegetal, isso indica que teoricamente todas as espécies possíveis de serem registradas pelo método utilizado, foram capturadas nessa categoria. O índice de Pielou (J) mostrou que a distribuição entre os indivíduos das espécies foi baixa e heterogênea na categoria G4, devido especialmente a dominância de *N. antunesi*, enquanto que nas demais categorias foram observadas uma distribuição mais homogênea das espécies.

O índice de similaridade mostrou que as categorias com o mesmo padrão de cobertura vegetal, possuem uma fauna flebotômica ocorrendo simultaneamente, com pequenas variações. Isso foi observado nas categorias G1 e G2, ambas com uma baixa cobertura vegetal. Apesar do alto índice de similaridade entre essas categorias, a maioria das espécies ocorreram em todas as categorias, de modo que os diferentes perfis de desmatamento e densidade populacional humana afetaram de maneira semelhante as populações de flebotomíneos. Silva & Castellón (2010) em um estudo comparativo de três fragmentos florestais de tamanhos diferentes em Manaus, encontraram índices similaridades

relativamente próximos, indicando uma uniformidade das espécies de flebotomíneos entre essas áreas.

Os resultados do presente trabalho mostraram que tanto o desmatamento, quanto a densidade populacional humana causam influência na diversidade e abundância de flebotomíneos, e esses efeitos podem ser maiores nessas populações quando esses dois fatores estão associados. Enquanto o desmatamento pode levar a um rápido aumento no número de indivíduos seguido de uma redução nesse número, a densidade populacional humana pode produzir locais favoráveis para manutenção do ciclo de diversas espécies de flebotomíneos mais adaptáveis; quando é fornecido locais propícios para criadouros, descanso, reprodução e disponibilidade de fontes de repasto. Torres (2005) estudou a fauna de flebotomíneos em fragmentos de floresta, e assinalou que as populações são bastante diversificadas em fragmentos de diferentes tamanhos e que vetores infectados persistem em fragmentos de até um hectare.

6. 3. Abundância, diversidade, similaridade e riqueza por ambiente

A maior abundância de espécies capturadas foi no peridomicílio principalmente nos abrigos de animais como galinheiro e chiqueiro, enquanto a maior diversidade de espécies foi observada no ambiente de floresta. Teodoro *et al.* (1993) estudaram o comportamento de flebotomíneos em ambientes florestais e extraflorestais no Paraná e observaram que 95,8% dos flebotomíneos foram capturados no ambiente peridomiciliar e domiciliar, sendo 82% capturados dentro de um galinheiro. Rebêlo *et al.* (1999) em um estudo na Amazônia Maranhense sobre riqueza e abundância de flebotomíneos, também observaram uma maior abundância de espécies no peridomicílio; já a maior diversidade e equitabilidade foram observadas na floresta, onde as espécies se apresentaram de forma mais homogênea. A maior similaridade foi entre floresta e borda, seguida de floresta e peridomicílio, essa mudança de comportamento sugere que a fauna antes estritamente silvestre, tende a se adaptar a ambientes com menos vegetação, provavelmente devido a disponibilidade de fontes de repasto. Ready *et al.* (1998) e Campbel-Lendrum *et al.* (2000) mostraram que populações de *N. whitmani* estão em franco processo de domiciliação, apresentando um perfil genético diferenciado das populações silvestres em áreas do sudoeste amazônico e áreas de maior desmatamento e de ocupação humana devido à inserção de novas fronteiras agrícolas.

A abundância de flebotomíneos pode aumentar mais rapidamente que sua diversidade em áreas peridomiciliares ao longo do tempo. A proximidade dos abrigos animais com a

borda da floresta pode atrair insetos pela acumulação de atrativos químicos como urina e CO₂ (Cameron *et al.*, 1991; Jimenez *et al.*, 2000). Ximenes *et al.* (1999) estudaram a densidade de flebotomíneos no Estado do Rio Grande do Norte e observaram a presença de fêmeas descansando após repasto e fêmeas grávidas em abrigos de animais domésticos sugerindo que as fêmeas podem ser atraídas para os abrigos em busca de repasto e proteção contra predadores e pressões ambientais.

A maior equitabilidade no pomar e capoeira é proveniente da baixa abundância de flebotomíneos, com registros pontuais e distribuição relativamente homogênea de espécies. Já o baixo valor da equitabilidade encontrado no ambiente de peridomicílio se deve provavelmente a predominância da espécie *N. antunesi* que representou um total de 66,72% de todas as espécies coletadas nesse ambiente, e assim, confirma a alta heterogeneidade da fauna desse ambiente e a conseqüente diminuição da diversidade local.

Os ambientes de floresta e borda de floresta apresentaram um maior índice de similaridade de espécies, provavelmente devido a semelhança entre a vegetação desses locais; já o alto índice de similaridade entre floresta e peridomicílio, sugere que muitas espécies possuem uma alta resiliência, adaptando-se, após a derrubada da floresta e colonização dessas áreas, aos novos ambientes (Ready *et al.*, 1998; Campbell-lendrum *et al.*, 2001; Galati *et al.*, 2003).

A alta abundância de vetores encontrados no peridomicílio indica uma maior vulnerabilidade às populações humanas, porém, essa proximidade pode facilitar as estratégias de controle da doença. Alguns estudos indicam que o maior pico de atividade de voo de flebotomos é entre 19:00 e 23:00 (Mayo *et al.*, 1998; Rebêlo, 2001; Gama-Neto, 2004), portanto, com essas informações é possível evitar a exposição humana aos vetores diminuindo as chances de infecção. A utilização de fitas impregnadas com piretróides colocadas ao redor de portas também diminuem a densidade de flebotomíneos dentro das casas, assim como a pulverização de inseticidas nas paredes externas das casas, usos de mosquiteiros e/ou uso de repelentes diminuem o contato dos vetores com as populações humanas (Campbell-Lebrum *et al.*, 2001). Um estudo piloto para controle de *N. umbratilis* realizado no bairro São José, Manaus, no ano de 1980, revelou que a aplicação de D.D.T. em bases de árvores impediu a ocupação por *N. umbratilis* por 11 meses seguidos. Teodoro (2004) no Paraná estudou a interação entre flebotomíneos e animais domésticos em uma área com alto grau de antropia, e observou que houve uma diminuição da abundância de flebotomíneos dos ambientes

peridomiciliares quando houve transferência de um abrigo animal para 100 metros de distância das residências.

6. 4. Abundância de espécies vetoras

No presente trabalho, foram capturadas cinco espécies vetoras de *Leishmania*: *N. antunesi*, *N. umbratilis*, *T. ubiquitous*, *P. amazonensis* e *B. flaviscutellata*. As espécies mais abundantes em todo estudo foram *N. antunesi* e *N. umbratilis*. Resultados semelhantes foram relatados por Dias-Lima *et al.* (2002) que estudaram a fauna de flebotomíneos em uma floresta primária de terra firme no Amazonas, e observaram uma maior abundância das espécies do gênero *Nyssomyia* (39,43%) e *Psychodopygus* (22,68%), assim como observado nesse trabalho.

A espécie *N. antunesi* está relacionada à transmissão de *Leishmania (Viannia) lindenberg* no Pará. Estudos em áreas antropizadas revelaram a presença da espécie, especialmente em abrigos de animais domésticos sendo mostrado um alto grau de adaptação a ambientes fragmentados (Rangel e Laison, 2009; Silveira *et al.*, 1991); resultados semelhantes a esses foram obtidos em Rio Pardo, onde *N. antunesi* foi a espécie mais abundante nas categorias G2 e G1, especialmente nos ambientes de peridomicílios que possuíam galinheiros. A adaptação a esses ambientes pode ser possível, pois, esses locais fornecem condições propícias para o desenvolvimento dessa espécie como: abundância de fontes de repasto, locais para reprodução e criadouros (possivelmente o solo úmido e com matéria orgânica dentro dos galinheiros), repouso e proteção contra dessecação.

A espécie *N. umbratilis* é a principal transmissora de *L. (V.) guyanensis* na Amazônia. Essa espécie é abundante tanto ao nível do solo, permanecendo nos troncos das árvores durante o dia, quanto na copa das árvores durante a noite quando sobem para fazer repasto sanguíneo. *Nyssomyia umbratilis* é uma espécie encontrada principalmente em florestas, porém alguns trabalhos mostram sua presença em bordas de matas próximas a moradias e ainda no peridomicílio de algumas casas (Feitosa e Castellon, 2006). Freitas *et al.* (2002) estudaram a fauna de flebotómos em um pequeno assentamento rural no Amapá e observaram *N. umbratilis* como uma das espécies mais abundantes em todos os locais de captura, com um alto número de indivíduos infectados por flagelados. Durante as capturas em Rio Pardo essa espécie foi mais abundante nas categorias G3 e G2, principalmente em ambientes florestais seguido de borda de mata, porém, foi encontrada também no pomar, capoeira e peridomicílio. A presença dessa espécie no peridomicílio e no pomar também sugere o estreito contato entre

vetor e o ser humano, e adverte que a transmissão da doença no assentamento pode ocorrer próximo às casas e não apenas nas áreas de floresta, ou seja, crianças e mulheres estão também vulneráveis a infecção por leishmânias, não sendo esse contato apenas aos homens que adentram na mata para caçar. Em um estudo sobre a fauna de quatro vetores durante a instalação do bairro Cidade Nova em Manaus, Paes (1991) mostrou a presença de *N. umbratilis* não apenas na floresta e no peridomicílio como dentro das casas.

A espécie *T. ubiquitous* é relacionada aos casos de LTA causadas pela *L.(V.) lainsoni* (Silveira e cols.) no Pará, apesar de apresentar baixa antropofilia em ambiente natural, foi observada picando humanos em laboratório (Silveira *et al.*, 1991; Rebêlo e Oliveira-Pereira, 2001; Rangel e Lainson, 2009). Em Rio Pardo essa espécie foi a quarta mais abundante do estudo, sendo encontrada principalmente nos ambientes peridomiciliares.

Além das três espécies vetoras mencionadas anteriormente neste estudo foram encontradas com certa frequência, outras duas espécies incriminadas como vetoras, *Psychodopigus amazonensis* e *B. flaviscutellata*, e duas espécies vetoras putativas, *N. anduzei* e *P. hirsutus hirsutus*. A espécie *P. amazonensis* está relacionada com a transmissão de *L. (V.) braziliensis* no Pará e é encontrada em toda região amazônica.

A espécie *B. flaviscutellata* foi incriminada por Laison e Shaw (1968) como a principal responsável pela transmissão de *L. (L.) amazonensis* que causa, além de LTA, pode causar uma forma mais grave da doença, a leishmaniose tegumentar difusa. *Bichromomyia flaviscutellata* é uma espécie encontrada em florestas de terra firme e igapós, florestas primárias ou secundárias e se adapta facilmente a plantações de *Pinus* e *Gmelina*; provavelmente se alimentam do sangue de roedores encontrados nesses tipos de ambientes, essa espécie de flebotomíneo tem voo baixo, não é muito antropófila e pica o homem especialmente quando este entra em florestas de igapó, onde esta espécie é mais abundante (Ward *et al.*, 1973; Shaw e Lainson, 1987; Rangel e Lainson, 2009). No presente estudo, a maior abundância dessa espécie foi no ambiente florestal, seguido de borda, peridomicílio e pomar, sendo que nenhum espécime foi capturado na capoeira; a ausência da espécie na capoeira pode estar relacionado a escassez de roedores nesse ambiente, que provavelmente são atraídos por lixo e dejetos de animais domésticos no peridomicílio, e por frutas no pomar, tornando o ambiente de capoeira pouco atrativo para esses roedores e consequentemente para *B. flaviscutellata*. Oliveira *et al.* (2003) estudaram a fauna de flebotomíneos no Mato Grosso do Sul e também observaram uma maior abundância dessa espécie na área florestal seguido

de peridomicílio; assim como os estudos de Dorval *et al.* (2010) em uma área de ocorrência de *L. (L.) amazonensis*, onde registraram a presença de *B. flaviscutellata* predominantemente na floresta. Apesar da maior abundância dessa espécie no presente estudo ter sido em ambiente florestal e de sua baixa antropofilia, a presença da mesma no peridomicílio deixa as populações humanas vulneráveis ao contato com o parasita.

A espécie *N. anduzei* é uma provável vetora de *L. (V.) guyanensis* e foi encontrada naturalmente infectada por este parasita juntamente com *N. umbratilis* na região Amazônica, enquanto, *P. hirsutus hirsutus* foi encontrada naturalmente infectada com *L. (V.) braziliensis* no Pará (Arias e Freitas, 1978; Shaw e Lainson, 1987; Rangel e Lainson, 2009). No presente trabalho, *N. anduzei* foi mais abundante na categoria de ambiente com alta densidade populacional e alto cobertura vegetal (G3), principalmente nos ambientes de floresta e borda, sendo encontrados também no peridomicílio; já *P. hirsutus hirsutus* teve apenas dois indivíduos coletados na borda de floresta também na categoria G3, possivelmente, o número baixo da espécie nas capturas é devido ao hábito florestal da mesma.

A presença dessas espécies vetoras no Assentamento de Rio Pardo, especialmente nos ambientes de borda de mata e peridomicílio, sugere que alguns casos da doença registrados no assentamento possam ser de origem peridomiciliar; sendo ressaltado aqui a importância das medidas de controle da doença nas proximidades das casas, sobretudo, em casas com abrigos de animais domésticos nos arredores.

6.5. Taxas de infecção natural

No presente estudo, 50 indivíduos foram analisados para observação de infecção natural, porém, nenhuma das amostras foi positiva para tripanossomatídeos. Esses resultados se assemelham aos resultados obtidos por Neitzke *et al.* (2008) no estado do Maranhão onde 1.230 fêmeas foram submetidas a PCR e nenhuma amostra foi positiva.

Alguns trabalhos detectaram baixas taxas de infecção por *Leishmania* spp. em flebotomíneos silvestres, como o trabalho de Oliveira-Pereira *et al.* (2006) no Maranhão onde encontraram uma taxa de infecção de 0,4%; Pita-Pereira *et al.* (2011) observaram infecção natural em *Pintomyia fischeri* em Porto Alegre e encontraram uma taxa de infecção de 0,38%.

Na região Amazônica, as taxas de infecção são mais elevadas que em outras regiões do país em vetores capturados em bases de árvores; entretando, as taxas são menores em flebotomíneos capturados em armadilhas de luz. Gomes e Franco (2011) registraram uma taxa

de 1,96% em *N. umbratilis* capturados em cinco bases militares na Rodovia AM-010 (Manaus-Itacoatiara); Pinheiro *et al.* (2008) mostraram que mesmo em *N. umbratilis* capturados em base de árvore a taxa de infecção foi baixa (1,66%) por meio de dissecação de fêmeas e por Reação em cadeia de polimerase (PCR) no Amazonas. Naturalmente, os flebotomíneos apresentam baixa carga parasitária o que diminui as chances de detecção (Killick-Kendrick, 1990; Silva e Gomes, 2001)). As baixas taxas encontradas por PCR também podem ser devido a inibidores presentes no conteúdo digestório desses insetos que podem diminuir a sensibilidade da técnica (Aransay *et al.*, 2000).

Esses fatos podem em parte, explicar a não detecção de infecção nas amostras em Rio Pardo, mesmo devido a elevada densidade de vetores capturados. Porém, a não detecção de infecção não exclui o risco de infecção pelo parasita por causa da presença de vetores próximos a residências, especialmente de *N. umbratilis*.

7. CONCLUSÕES

A fauna de flebotomíneos em Rio Pardo é bastante diversificada, variando de acordo com o ambiente;

Em Rio Pardo, a diversidade de flebotomíneos é maior em ambientes de floresta e menor em capoeiras, assim como a abundância é maior em peridomicílios que na floresta;

A espécie *N. antunesi* apresentou maior abundância no estudo, principalmente no peridomicílio sendo sugerido nesse estudo, sua capacidade de adaptação a ambientes modificados;

As espécies do gênero *Nyssomyia* foram mais abundantes em ambientes com modificações antrópicas que as do gênero *Psychodopygus*, mostrando que as espécies de *Nyssomyia* possuem uma maior adaptabilidade a ambientes modificados;

A hipótese não encontrou sustentação ao fato que os diferentes graus de desmatamento e densidade populacional humana podem afetar de maneira semelhante as populações de flebotomíneos; mesmo em locais com elevado desmatamento e densidade populacional humana, a fauna de flebotomíneos é diversificada e abundante e algumas populações podem estabelecer ciclos peridomésticos;

Ambientes com alta densidade populacional humana mostraram uma alta abundância de indivíduos de flebotomíneos, sobre tudo em locais próximos a criadouros de animais;

A não detecção de infecção natural por *Leishmania* spp., não exclui a ocorrência de um ciclo peridoméstico da doença, principalmente devido a presença da *N. umbratilis* nos peridomicílios.

8. REFERÊNCIAS

- Acevedo, M. A; Arrivillaga, J. 2008. Eco-Epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae). *Boletín de Malariología y Salud ambiental*, 48 (1): 3-16.
- Aguiar, G. M.; W. M. Medeiros. 2003. Distribuição regional de habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. p. 207-256. *In: Rangel E. F. & R. Lainson (Org.) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, iii+367 p*
- Aguiar, G. M.; Vilela, M. L.; Lima, R. B. 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82 (4): 583-584.
- Agum, R.; Buss, D. F.; Grimmer, G.; Nogueira, D.; Luz, S. L. B.; Pessoa, F. A. C.; Rios - Velásquez, C. M; Abad-Franch, F. 2008. Understanding the relationships between social-environmental dynamics and vector-borne disease transmission in rural Amazonia. *In: International Forum Ecohealth. Conference program International Ecohealth Forum: 215p*
- Amóra, S.S; Bevilaqua, C. M; Feijó, F. M; Oliveira, P. G; Peixoto, G. C; Sousa, R. N; Alves, N.D.; Oliveira, L.M.; Macedo, I.T. 2010. Sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) survey in an urban transmission area of visceral leishmaniasis, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(4):233-237.
- Aransay, A.; Scoulica, E.; Tselentis, Y. 2000. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1933-1938.
- Arias, J. R.; Freitas, R.A. 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2: incidência de flagelados em flebótomos selváticos. *Acta Amazônica*, 8(3):387-396
- Arias, J. R.; Freitas, R.A. 1982. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 3. Phlebotominae Sand fly stratification in a terra firme forest. *Acta Amazônica*, 12(3): 599-608
- Arias, J. R.; Naiff, R.D. 1981. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon

- Basin of Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene*, 75 (4): 537-541
- Ashford, R. W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30: 1269-1281.
- Ayres, M.; Ayres Jr, M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. 2000. Biostat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas, 272p.
- Bañuls, A. L.; Hide, M.; Prugnolle, F. 2007. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1-109 p.
- Barbosa, M. G. V.; Fé, N. F.; Marcião, A. H. R.; 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.
- Barrett, T. V., Freitas, R. A., Albuquerque, M. I. C.; Guerrero, J. H. C. 1996. Report on a collection of *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 27-35.
- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, (37): 1097–1106.
- Bates, P. A. 2008. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4): 340-344.
- Bittencourt, I. A. 2008. Infecção natural por *Leishmania* sp. em flebotomíneos capturados no foco de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Piçarras, litoral norte do Estado de Santa Catarina e identificação específica do parasito em amostras clínicas e em cepas isoladas de pacientes. Trabalho de graduação, Universidade de Santa Catarina. 35 p.
- Brandão Jr., A.; Souza Jr., C. 2006. Deforestation in land reform settlements in the Amazon. *State of the Amazon*, 7:1-4
- Cameron, M. M.; Amerasinghe, F. P.; Lane, R. P. 1991. The field response of Sri Lankan sandflies & mosquitoes to synthetic cattle-derived attractants. *Parassitologia* 3.3 (Suppl): 119–126.

- Cameron, M. M.; Pessoa, F. A.; Vasconcelos, A. W.; Ward, R. D. 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medicine and Veterinary Entomology*, 9:263-272
- Campbell-Ledrum, D. H.; Dujardin, J. P.; Martinez, E.; Feliciangeli, M. D.; Enrique Perez, J.; Silans, L. N. M. P.; Desjeux, P. 2001. Domestic and Peridomestic Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing Epidemiological Patterns Present New Control Opportunities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (2): 159-162
- Carvalho, G. M.; Gontijo, C. M.; Falcão, A. L.; Andrade Filho, J. D. 2010. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 47(6): 972-976.
- Castellón, E. G. B., *Lutzomyia* sand flies in the Brazilian Amazon basin (Diptera: Psychodidae). 2009. Editora INPA, Manaus, Amazonas, 202pp.
- Castellón, E. G. B.; Arias, J. R.; Freitas, R. A.; Naiff, R. D. 1994. Os flebotomíneos da região amazônica, estrada Manaus-Humaitá, estado do Amazonas, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Acta Amazônica*, 24 (1/2): 91- 102.
- 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
- Chagas, A. C.; Pessoa, F. A. C.; Medeiros, J. F.; Py-Daniel, V.; Mesquita, E. C.; Balestrassi, D. A. 2006. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitanga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 9(2): 186-192
- Confalonieri, U. E. C. 2000. Environmental Change and Human Health in the Brazilian Amazon. *Global Change & Human Health*, 1(2): 174-183.
- CPRM – Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (1998) *Sócio-economia do município de Presidente Figueiredo – AM*. Serviço Geológico do Brasil, Ministério de Minas e Energia.
- Dedet JP. 1999. Leishmanioses tégumentaires. In *Les Leishmanioses*, Ed. Ellipses Univerisités Francophones, 175p

- Desjeux, P. 2001. The Increase in Risk Factors for the Leishmaniasis. *Worldwide Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 239–43.
- Dias-Lima, A.; Bermúdez, E. C.; Medeiros, J. F.; Sherlock, I. 2002. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 18(3): 823-832.
- Dorval, M. E. C.; Alves, T. P.; Cristaldo, G.; Rocha, H. C.; Alves, M. A.; Oshiro, E. T.; Oliveira, A. G.; Brazil, R. P.; Galati, E. A.; Cunha, R. V. 2010. Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in State of Mato Grosso do Sul, Mid-western Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43 (5):491-495.
- Feitosa, M. A. C.; Castellón, E. G. 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amazônica*, 34 (1): 121-127.
- Feitosa, M. A. C.; Castellón, E. G. 2006. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazônica*, 36(4): 539 - 548
- Feitosa, M. A. C.; Bermúdez, E. G. C. 2009. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) na periferia de Santarém (PA). Estratificação horizontal e fatores agravantes para transmissão domiciliar de Leishmanioses. *Recia*, 1(2): 217-222.
- Feliciangeli, M. D. 1987. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species compositions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 119-124.
- Figueiredo, M. L.G.; Almério de C Gomes, A.C.; Amarilla, A. A.; Leandro, A.S.; Orrico, A. S.; Araujo, R. F.; Castro, J. S. M.; Durigon, E. L.; Aquino, V. H.; Figueiredo, L. T. M. 2010 Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virology Journal*, 7:152.
- Forattini, O. P.; Juarez, E.; Bernadi, L.; Dauer, C. 1959. Leishmaniose tegumentar no Território do Amapá, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 1: 11-17.

- Forattini, O. P. 1973. *Entomologia Médica*, vol. 4. São Paulo. Ed. Edgard Blucher & Ed. US, 658p
- Forattini, O. P.; Pattoli, D. G. B.; Rabello, E. X.; Ferreira, A. O. 1972. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 6: 431-433
- Freitas, R. A.; Naiff, R. D.; Barrett, T. V. 2002. Species Diversity and Flagellate Infections in the Sand Fly Fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1): 53-59.
- Galati, E. A. B.; Nunes, V. L. B.; Dorval, M. E. C.; Oshiro, E. T.; Cristaldo, G.; Espíndola, M. A.; Rocha, H. C.; Garcia, W. B. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 30:115-128.
- Galati, E. A. B. 2003. Classificação de Phlebotominae, p.23-51. In E.F. Rangel & R. Lainson organizadores, *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fiocruz, 367pp.
- Galati, E. A. B.; Nunes, V. L. B.; Boggiani, P. C.; Dorval, M. E. C.; Cristaldo, G.; Rocha, H. C.; Oshiro, E. T.; Gonçalves-de-Andrade, R. M.; Naufel, G. 2003. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47 (2): 283-296.
- Gama-Neto, J. L. 2004. Atividade horária de voo de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em um fragmento florestal no município de Manaus, Amazonas. *Dissertação de mestrado entregue ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/FUA*.
- Gama-Neto, J. L.; Freitas, R. A.; Baima, J. M.; Passos, M. A. B. 2010. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2):131-13.
- Gomes, L. H. M.; Franco, A. M. R. 2011. Variação mensal e infecção natural em *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, *Lutzomyia anduzei* Rozeboom, 1942, *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira, 1942 e *Lutzomyia olmeca nociva* Young & Arias, 1982 (Diptera: Psychodidae) por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em

área de treinamento militar na Amazônia, Amazonas. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2(2):75-76.

Gontijo, B.; Carvalho, M. L. R. 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.

Gotelli, N. J.; Colwell, R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4: 379-391.

Guerra, J. A. O.; Paes, M. G.; Coelho, L. I.; Coelho, M.; Barros, L. B.; Fé, N. F.; Barbosa, M. G. V.; Guerra, M. V. F. 2007. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM. *Acta Amazônica*, 37(1): 133 – 138

Guerra, J. A. O.; Prestes, S. R.; Silveira, H.; Coelho, L. I. A. R. C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M. G. V.; Ferreira, L. C. L. 2011. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *Plos: Neglected Tropical diseases*, 5 (3): 5p

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em >
<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=130353>< acessado em
 05/12/2011

Instituto Evandro Chagas. 1986. 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1: 305-320.

Jardine, A.; Cook, A.; Weinstein, P. 2008. The utility of mosquito-borne disease as na environmental monitoring tool in tropical ecosystems. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 1409-1414.

Jimenez, A. E.; Rojas, J. C.; Vargas, F.; Herrero, M. V. 2000. Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, 37: 216-221

Justiniano, S. C. B; Chagas, A. C.; Pessoa, F. A. C.; Queiroz, R.G. 2004. Comparative biology of two populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) of central

- Amazonia, Brazil, under laboratory conditions. *Journal Brazilian of Biology*, 64 (2): 227-235.
- Kato, H.; Uezato, H.; Katakura, K.; Calvopiña, M.; Marco, J. D.; Barroso, P. A.; Gomez, E. A.; Mimori, T.; Korenaga, M.; Iwata, H.; Nonaka, S.; Hashigushi, Y. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 87-93.
- Kawa, H; Sabroza, P. C. Oliveira, R. M.; Barcellos, C. 2010. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 26(8): 1495-1507.
- Killick-Kendrick R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 1-24.
- 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 and Leishmaniasis of the new world, with particular reference to Brazil. *Bulletin of the Pan-American Health Organization*, 7:1-19.
- Lainson, R.; Shaw J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution In The Leishmaniasis. in *Biology and Medicine*, Vol 1 W Peters, R Killick-Kendrick (eds), Academic Press, London, 1-120.
- Lainson, R.; Shaw, J. J; Ward, R. D.; Fraiha, H. 1973. Leishmaniasis in Brazil: IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex: importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. *Transation Royal Sociaty of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 184-196.

- Lainson, R.; Shaw, J. J.; Silveira, F. T.; Souza, A. A. A.; 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: 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. 1971. Phlebotomid sandflies. *World Health Organization*. 44: 535- 551.
- Magurran, A. E. 2005. Species abundance distributions: pattern or process? *Functional ecology*, 19: 177-181.
- Marchon-Silva, V.; Caër, J. C.; Rory James Post, R. J.; Maia-Herzog, M.; Fernandes, O. 2007. Detection of *Onchocerca volvulus* (Nematoda: Onchocercidae) infection in vectors from Amazonian Brazil following mass Mectizan™ distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 000
- Marzochi, M. C. A. 1989. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: *Grandes Endemias Brasileiras*. Editora Universidade de Brasília.
- Mathers, C. D.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L. 2006. The burden of disease and mortality by condition: data, methods, and results for 2001. In: A. D. Lopez, C. D. Mathers, M. Ezzati, D. T. Jamison, C. J. L Murray (eds.) *Global Burden of Disease and Risk Factors*. Oxford University Press/The World Bank, 45-240.
- Mayo, R. C.; Casanova, C.; Mascarini, L. M.; Pignatti, M. G.; Rangel, O.; Galati, E. A. B.; Dalva Wanderley, D. M. V.; Corrêa, F. M. A. 1998. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31 (4): 339-345.
- Michalsky, E. M.; Fortes-Dias, C. L.; Pimenta, P. F. P.; Secundino, N. F. C.; Dias, E. S. 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 44: 255-259.
- Moreno, M.; Cano, J.; Nzambo, S.; Bobuakasi, L.; Buatiche, J. N.; Ondo, M.; Micha, F.; Benito, A. 2004. Malaria Panel Assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, 3: 20

- Neitzke, H. C., Scodro, L. B. R., Castro, R. R. K., Sversutti, D. C. A., Silveira, V. G. T., Teodoro U. 2008. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, 41(1).
- Nery, L. C. R.; Lorosa, E. S.; Franco, A. M. R. 2004. Feeding preference of Sand Flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an Urban forest in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6): 571-574.
- Nunes, V. L. B.; Galati, E. A. B.; Cardozo, C.; Rocca, M. E. G.; Andrade, A. R. O.; Santos, M. F. C.; Aquino, R. B.; Rosa, D. 2008. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3): 446-451.
- Oliveira, A. G.; Andrade Filho, J. D.; Falcão, A. L.; Brazil, R. P. 2003. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae, phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Caderno de Saúde Pública*, 19 (4): 933-944.
- 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: 540-543.
- Oumeshi, Y. O. 1999. Cutaneous Leishmaniasis: A historical perspective. *Clinics in Dermatology*, 17: 249-254.
- 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.
- Pauvolid-Corrêa, A.; Tavares, F. N.; Alencar, J.; Silva, J. S; Murta, M.; Serra-Freire, N. M; Pellegrin, A. O.; Gil-Santana, H.; Guimarães, A.E.; Silva, E.E. 2010. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Rev Inst Med Trop*, São Paulo 52: 17-24.

- Patz, J. A.; Graczyk, T. K.; Geller, N.; Vittor, A. Y. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*, 30: 1395-1405.
- Pessoa, F. A. C.; Medeiros, J. F.; Barret, 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 do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5): 593-599
- Pinheiro, F. G.; Luz, S. L. B.; Franco, A. M. R. 2008. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Revista Acta Amazônica*, 38(1): 165-172.
- Pita-Pereira, D.; Souza, G. D.; Pereira, T. A.; Zwetschb, A.; Britto, C.; Rangel, E. F. 2011. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta Tropica*, 120: 273–275
- Póvoa, M.M.; Souza, R. T. L.; Lacerda, R. N. L.; Rosa, E. S.; Galiza, D.; Souza, J. R.; Wirtz, R.A.; Schlichting, C.D; Conn, J.E. 2006. The importance of *Anopheles albittarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.101 no.2
- 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.; Souza, A. A.; Rebêlo, J. M. M.; Day, J. C.; Silveira, F. T.; Campbell-Ledum, D.; Davies, C. R.; Costa, J. M. L. 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south-east boundary of Amazonian, Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 87-187-195.
- Rebêlo, J. M.; Araújo, M. Carvalho; S. T. Oliveira & E. S Silva. 1999. Flebotomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona golfão maranhense, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 247–253.
- Rebêlo, J. M. M. 2001. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(1):221-227.

- Rebêlo, J. M. M.; Rocha, R. V.; Moraes, J. L. P.; Alves, G. A.; Leonardo, F. S. 2009. Distribuição de *Lutzomyia whitmani* em fitorregrões do estado do Maranhão, Brasil. *Revista de Saúde Pública*; 43(6):1070-1074.
- Rebêlo, J. M. M.; Oliveira-Pereira, Y. N. 2001. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de matas de terra firme e várzeas, do município de Paragominas, Estado do Pará, Brasil. *Acta Amazônica*, 31 (1): 145-154.
- Rebêlo, J. M.; Oliveira, S. T.; Barros, V. L. L.; Silva, F. S.; Costa, J. M. L.; Ferreira, L. A.; Silva, A. R. 2000. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(1):11-19.
- Rezende, H. R.; Sessa, P. A.; Ferreira, A. L.; Santos, C. B.; Leite, G. R.; Falqueto, A. 2009. Efeitos da implantação da Usina Hidrelétrica de Rosal, Rio Itabapoana, Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2):160-164.
- Rodríguez-Peréz, M.A.; Danis-Lozano, R.; Rodriguez, M. H.; Unnasch, T. R.; Bradley. 1999. Detection of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium ochraceum* sensu lato: comparison of a PCR assay and y dissection in a Mexican hypoendemic community. *Parasitology*, 119, 613±619
- Romero, G. A. S.; Guerra, M. V. F.; Paes, M. G.; Macêdo, V. O. 2002. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1304-1312.
- Ryan L 1986. Flebótomos do Estado do Pará, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Instituto Evandro Chagas*, Ministério da Saúde, Belém, 154 pp.
- Saraiva, L.; Carvalho, G. M. L.; Sanguinette, C. C.; Carvalho, D. A. A.; Falcão, A. L.; Andrade Filho, J. D. 2008. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8): 843-846.
- Shaw, J. J.; Lainson, R.; 1987. Ecology and epidemiology: New World. In *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Peters, W.; Killick-Kendrick, R. (eds), Academic Press, London, 1: 291-363

- Silva, A. C.; Gomes, A. C. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, Vianna, 1911. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 187-191
- Silva, M. N. T.; Castellón, E. 2010. Similaridade da fauna flebotomínica de três fragmentos florestais em área urbana do município de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Revista Colombiana de ciência animal*, 2 (1): 85- 92.
- 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, AM. *Neotropical Entomology*, 36(1): 138-144.
- 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*) *lainson* in Pará State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1): 127-130.
- Sinan/SVS/MS, 2009. *Sistema de informações de agravos de notificação*/ Secretaria de Vigilância em saúde/ Ministério da Saúde. Atualizado em 09/09/09
- Soares, L. S. 2010. *Fatores de risco de leishmaniose cutânea em duas populações humanas da amazônia central*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 58pp
- Souza, G. D; Flores, B. R. D. G. C; Santos, S. R. E; Azevedo, M. V. A; Rangel, E. F. 2008. Monitoramento entomológico dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre-RS. *Boletim Epidemiológico*, Ano X, 39: 5-6.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. 2007. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2ª Ed.182pp.
- Tadei, W.P .; Thatcher, B. D.; Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B.; Rafael, M. S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 325-335.
- Tammam, M. A.; Plazuelo, S.; Ta, T. tiempo real versus PCR a tiempo final diagnóstico de tripanosomiasis humana africana. *Enfermedades emergentes*, 10 (1): 54-55
- Teodoro, U.; Salvia Filho, V.; Lima, E. M.; Spinosa, R. P.; Barbosa, O. C.; Ferreira, M. E. M. C; Lonardoni, M. V. C. 1993. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos

- em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 27 (4): 242-249.
- Teodoro, U.; Kuhl, J. B.; Rodrigues, M.; Santos, E. S.; Santos, D. R.; Maróstica, L. M. F. 1998. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, sul do Brasil. Estudo preliminar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(6): 517-522.
- Teodoro, U.; Thomaz-Soccol, V.; Kuhl, J. B.; Santos, D. R.; Santos, E. S.; Santos, A. R.; Abbas, M.; Dias, A. C. 2004. Reorganization and Cleanness of Peridomiciliar Area to Control Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (2): 205-212.
- Torres, W. M.P. 2005. *Diagnóstico da diversidade de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em uma paisagem fragmentada no Amazonas, Brasil*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais INPA/UFAM, Manaus, Amazônia.
- Valderrama, A.; Tavares, M. G.; Andrade Filho, J. D. 2011. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8): 1024-1031.
- Vilela, D. R. 2003. *Análise sócio-ambiental do Assentamento Rio Pardo, Município de Presidente Figueiredo/AM*. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus.
- Ward, R. D.; Shaw, J. J.; Lainson, R.; Fraiha, H. 1973. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotominae fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajás, Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67 (2): 174-183.
- Wash, J. F.; Molyneux, D.; Birley, M. H. 1993. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology*, 106: 55-75.
- Wolda, H. 1981. *Similarity indices, sample size and diversity*. *Oecologia*, 50 (3): 296-302
- Ximenes, M. F. F. M.; Souza, M. F.; Castellón, E. G. 1999. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (4): 427-432.

- Young, D. G.; Duncan, M. A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Florida, *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 881pp.
- Zeidler, J.D.; Amézaga Acosta, P.O.A.; Barrêto, P.P.; Joel da Silva Cordeiro, J. S. 2008. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 42(6)
-

APÊNDICE A

Espécies de flebotomíneos, n° e proporção de machos e fêmeas de cada espécie, total de indivíduos coletados no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécies	♂♂	%	♀♀	%	Total	% Total
<i>Brumptomyia brumpti</i> (Larrousse)	3	0,16	11	0,95	14	0,46
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i> (Mangabeira)	39	2,04	37	3,18	76	2,47
<i>Bichromomyia olmeca nociva</i> (Young & Arias)	3	0,16	14	1,20	17	0,55
<i>Bichromomyia reducta</i> (Felicangeli, Ramirez Pérez & Ramirez)	1	0,05	13	1,12	14	0,46
<i>Evandromyia inpai</i> (Young & Arias)	22	1,15	3	0,26	25	0,81
<i>Evandromyia monstrosa</i> (Floch & Abonnenc)	14	0,73	36	3,10	50	1,63
<i>Evandromyia Pinotti</i> (Damasceno & Arouk)	0	0,00	5	0,43	5	0,16
<i>Evandromyia saulensis</i> (Floch & Abonnenc)	0	0,00	3	0,26	3	0,10
<i>Evandromyia sericea</i> (Floch & Abonnenc)	0	0,00	19	1,63	19	0,62
<i>Evandromyia walkeri</i> (Newstead)	42	2,20	88	7,57	130	4,23
<i>Evandromyia williamsi</i> (Damasceno, Causey & Arouk)	1	0,05	4	0,34	5	0,16
<i>Lutzomyia flabelata</i> (Martins & Silva)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Lutzomyia baityi</i> (Damasceno, Causey & Arouk)	2	0,10	0	0,00	2	0,07
<i>Lutzomyia gomezi</i> (Nitzulescu)	0	0,00	1	0,09	1	0,03
<i>Lutzomyia sherlocki</i> (Martins, Silva & Falcão)	0	0,00	1	0,09	1	0,03
<i>Micropygomyia chassigneti</i> (Floch & Abonnenc)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Micropygomyia micropyga</i> (Mangabeira)	37	1,94	0	0,00	37	1,20
<i>Micropygomyia pilosa</i> (Damasceno & Causey)	0	0,00	2	0,17	2	0,07
<i>Micropygomyia rorotaensis</i> (Floch & Abonnenc)	97	5,08	97	8,34	194	6,31
<i>Nyssomyia anduzei</i> (Rozeboom)	67	3,51	83	7,14	150	4,88
<i>Nyssomyia antunesi</i> (Coutinho)	917	48,01	108	9,29	1025	33,36
<i>Nyssomyia richardwardi</i> (Ready & Fraiha)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Nyssomyia shawi</i> (Fraiha, Ward & Ready)	2	0,10	1	0,09	3	0,10
<i>Nyssomyia umbratilis</i> (Ward & Fraiha)	142	7,43	306	26,31	448	14,58
<i>Nyssomyia yulli yulli</i> (Young & Porter)	0	0,00	1	0,09	1	0,03
<i>Pressatia choti</i> (Floch & Abonnenc)	26	1,36	1	0,09	27	0,88

Espécies de flebotomíneos, nº e proporção de machos e fêmeas de cada espécie, total de indivíduos coletados no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécies	Machos	%	Fêmeas	%	Total	% Total
<i>Pressatia triachanta</i> (Mangabeira)	2	0,10	0	0,00	2	0,07
<i>Pressatia trispinosa</i> (Mangabeira)	19	0,99	0	0,00	19	0,62
<i>Psathyromyia abonnenci</i> (Floch & Chassignet)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Psathyromyia aragaoi</i> (Costa Lima)	22	1,15	9	0,77	31	1,01
<i>Psathyromyia campbelli</i> (Damasceno, Causey & Arouk)	1	0,03	0	0,00	0	0,03
<i>Psathyromyia cuzquena</i> (Martins, Llanos & Silva)	2	0,10	0	0,00	2	0,07
<i>Psathyromyia dreisbachi</i> (Causey & Damasceno)	23	1,20	8	0,69	31	1,01
<i>Psathyromyia inflata</i> (Floch & Abonnenc)	3	0,16	0	0,00	3	0,10
<i>Psathyromyia lutziana</i> (Costa Lima)	10	0,52	1	0,09	11	0,36
<i>Psathyromyia punctigeniculata</i> (Floch & Abonnenc)	27	1,41	2	0,17	29	0,94
<i>Psathyromyia scafffi</i> (Damasceno & Arouk)	1	0,05	10	0,86	11	0,36
<i>Psychodopygus amazonensis</i> (Root)	47	2,46	35	3,01	82	2,67
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i> (Barreto)	10	0,52	0	0,00	10	0,33
<i>Psychodopygus chagasi</i> (Costa Lima)	5	0,26	47	4,04	52	1,69
<i>Psychodopygys clautrei</i> (Abonnenc, Léger & Fauran)	17	0,89	37	3,18	54	1,76
<i>Psychodopygus davisii</i> (Root)	28	1,47	60	5,16	88	2,86
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> (Mangabeira)	2	0,10	0	0,00	2	0,07
<i>Psychodopygus squamiventris squamiventris</i> (Lutz & Neiva)	3	0,16	16	1,38	19	0,62
<i>Sciopemyia nematoducta</i> (Young & Arias)	13	0,68	20	1,72	33	1,07

Espécies de flebotomíneos, nº e proporção de machos e fêmeas de cada espécie, total de indivíduos coletados no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécies	Machos	%	Fêmeas	%	Total	% Total
<i>Sciopemyia pennyi</i> (Arias & Freitas)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Sciopemyia sordelli</i> (Shannon & Del Ponte)	0	0,00	48	4,13	48	1,56
<i>Trichophoromyia eurypyga</i> (Martins, Falcão & Silva)	99	5,18	0	0,00	99	3,22
<i>Trichophoromyia gibba</i> (Young & Arias)	1	0,05	0	0,00	1	0,03
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> (Mangabeira)	138	7,23	26	2,24	164	5,34
<i>Trichopygomyia trichopyga</i> (Floch & Abonnenc)	6	0,31	4	0,34	10	0,33
<i>Viannamyia furcata</i> (Mangabeira)	5	0,26	5	0,43	10	0,33
<i>Viannamyia tuberculata</i> (Mangabeira)	7	0,37	1	0,09	8	0,26
Total	1910	100,00	1163	100,00	3073	100,00

APÊNDICE B- Abundância e diversidade de espécies de flebotomíneos capturados por categoria de ambiente no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécie	Categorias								Total
	Grupo1		Grupo2		Grupo3		Grupo4		
	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	
<i>Bumptomys brumpti</i>	1	0,13	1	0,17	9	0,79	3	0,51	14
<i>Bichromomyia flaviscutelata</i>	25	3,30	27	4,55	15	1,32	9	1,54	76
<i>Bichromomyia olmeca nociva</i>	4	0,53	1	0,17	11	0,97	1	0,17	17
<i>Bichromomyia reducta</i>	8	1,06	4	0,67	2	0,18	0	0,00	14
<i>Evandromyia inpai</i>	2	0,26	4	0,67	19	1,67	0	0,00	25
<i>Evandromyia monstrosa</i>	12	1,58	25	4,21	10	0,88	3	0,51	50
<i>Evandromyia Pinotti</i>	1	0,13	3	0,51	1	0,09	0	0,00	5
<i>Evandromyia saulensis</i>	2	0,26	0	0,00	1	0,09	0	0,00	3
<i>Evandromyia sericea</i>	6	0,79	0	0,00	6	0,53	7	1,19	19
<i>Evandromyia walkeri</i>	16	2,11	20	3,37	46	4,05	48	8,19	130
<i>Evandromyia williamsi</i>	3	0,40	1	0,17	0	0,00	1	0,17	5
<i>Lutzomyia flabelata</i>	0	0,00	1	0,17	0	0,00	0	0,00	1

Abundância e diversidade de espécies de flebotomíneos capturados por categoria de ambiente no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécie	Categorias								Total
	Grupo1		Grupo2		Grupo3		Grupo4		
	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	
<i>Lutzomyia baityi</i>	2	0,26	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Lutzomyia gomezi</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,09	0	0,00	1
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	0	0,00	1	0,17	0	0,00	0	0,00	1
<i>Lutzomyia chassigneti</i>	1	0,13	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Micropygomyia micropyga</i>	7	0,92	8	1,35	7	0,62	15	2,56	37
<i>Micropygomyia pilosa</i>	1	0,13	1	0,17	0	0,00	0	0,00	2
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	12	1,58	48	8,08	117	10,31	17	2,90	194
<i>Nyssomyia anduzei</i>	42	5,54	26	4,38	77	6,78	5	0,85	150
<i>Nyssomyia antunesi</i>	360	47,49	75	12,63	251	22,11	339	57,85	1025
<i>Nyssomyia richardwardi</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,09	0	0,00	1
<i>Nyssomyia shawi</i>	0	0,00	0	0,00	3	0,26	0	0,00	3
<i>Nyssomyia umbratilis</i>	56	7,39	166	27,95	205	18,06	21	3,58	448

Abundância de espécies de flebotomíneos capturados por categoria de ambiente no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécie	Categorias								Total
	Grupo1		Grupo2		Grupo3		Grupo4		
	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	
<i>Nyssomyia yulli yulli</i>	1	0,13	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Pressatia choti</i>	1	0,13	1	0,17	24	2,11	1	0,17	27
<i>Pressatia triachanta</i>	2	0,26	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2
<i>Pressatia trispinosa</i>	5	0,66	3	0,51	11	0,97	0	0,00	19
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	1	0,13	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1
<i>Psathyromyia aragai</i>	10	1,32	6	1,01	12	1,06	3	0,51	31
<i>Psathyromyia campbelli*</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0
<i>Psathyromyia cuzquena</i>	0	0,00	0	0,00	2	0,18	0	0,00	2
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	12	1,58	7	1,18	11	0,97	1	0,17	31
<i>Psathyromyia inflata</i>	0	0,00	0	0,00	2	0,18	1	0,17	3
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	0,13	3	0,51	6	0,53	1	0,17	11

Abundância de espécies de flebotômíneos capturados por categoria de ambiente no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécie	Categorias								Total
	Grupo1		Grupo2		Grupo3		Grupo4		
	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	
<i>Psathyromyia scaffi</i>	4	0,53	4	0,67	2	0,18	1	0,17	11
<i>Psychodopygus amazonenses</i>	7	0,92	25	4,21	45	3,96	5	0,85	82
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	0	0,00	2	0,34	7	0,62	1	0,17	10
<i>Psychodopygus chagasi</i>	21	2,77	12	2,02	16	1,41	3	0,51	52
<i>Psychodopygys clautrei</i>	4	0,53	16	2,69	33	2,91	1	0,17	54
<i>Psychodopygus davisi</i>	11	1,45	26	4,38	49	4,32	2	0,34	88
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>	0	0,00	0	0,00	2	0,18	0	0,00	2
<i>Psychodopygus squamiventris squamiventris</i>	6	0,79	3	0,51	9	0,79	1	0,17	19
<i>Sciopemyia sordelli</i>	16	2,11	10	1,68	9	0,79	13	2,22	48
<i>Sciopemyia nematoducta</i>	9	1,19	11	1,85	9	0,79	4	0,68	33

Abundância de espécies de flebotômíneos capturados por categoria de ambiente no Assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil entre 2009 e 2010.

Espécie	Categorias								Total	
	Grupo1		Grupo2		Grupo3		Grupo4			
	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%	Nº indivíduos	%		
<i>Sciopemyia pennyi</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,09	0	0,00	1	
<i>Trichophoromyia eurypyga</i>	44	5,80	20	3,37	24	2,11	11	1,88	99	
<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	1	0,13	1	0,17	8	0,70	0	0,00	10	
<i>Trichophoromyia gibba</i>	0	0,00	1	0,17	0	0,00	0	0,00	1	
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	34	4,49	23	3,87	43	3,79	64	10,92	164	
<i>Viannamyia furcata</i>	3	0,40	5	0,84	2	0,18	0	0,00	10	
<i>Viannamyia tuberculata</i>	0	0,00	0	0,00	7	0,62	1	0,17	8	
Total	758		100	594	100	1135	100	586	100	3073

* Espécie com localização perdida.