



Ministério da
Ciência e Tecnologia



Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Programa de Pós-Graduação
Divisão do Curso de Entomologia – DCEN

Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) da Reserva Biológica de Campina - INPA da BR 174, Manaus, AM - Brasil

Maria Ivonei Carvalho Albuquerque

Manaus – Amazonas

2009

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Programa de Pós-Graduação
Divisão do Curso de Entomologia – DCEN

Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) da Reserva Biológica de Campina - INPA da BR 174, Manaus, AM - Brasil

Maria Ivonei Carvalho Albuquerque

Orientadora: Dra. Antonia Maria Ramos Franco

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

Manaus – Amazonas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

A345 Albuquerque, Maria Ivonei Carvalho

Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) da Reserva Biológica de Campina – INPA da BR 174, Manaus, AM - Brasil / Maria Ivonei Carvalho Albuquerque.- Manaus: [s.n.], 2009.

xiv, 74 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) - INPA, Manaus, 2009

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco

Área de concentração: Entomologia

1. *Lutzomyia flaviscutellata*. 2. Flebotomíneos. 3. Campinarana. 4. Nested PCR (Técnica). 5. Entomofauna. I.Título.

CDD 19. ed. 595.77

Sinopse:

A distribuição, diversidade e biologia de flebotomíneos foram estudadas utilizando coletas com armadilhas luminosas e isca animal em uma área da Reserva Biológica de Campina, na BR 174, Manaus-Boa Vista. Também foram realizados exames para detecção de infecção natural por exame direto e pela técnica de PCR. Os resultados deste trabalho corroboram para a compreensão da ecologia e epidemiologia dos vetores de leishmaniose na região do Amazonas, além de ser um dos pioneiros em áreas de mata de Campina. Esta área apresentou predominância de *Lutzomyia flaviscutellata* e o registro de 21 outras espécies em menor quantidade. Evidenciou-se infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) sp. em *L. flaviscutellata*, *L. georgii* e *L. olmeca nociva*, nas áreas estudadas indicando a possibilidade de transmissão de leishmaniose.

Palavras-chave: 1. *Lutzomyia flaviscutellata* 2. Campinarana 3. Nested - PCR 4. flebotomo 5. Inseto vetor.

Dedicatória

“A Deus por me dar condições de vencer os obstáculos da vida e aos meus filhos Évelyn e Pedro Neto pelo amor incondicional, mesmo em situações de abandono”.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos meus filhos - Évelyn e Pedro Neto, que souberam compreender os momentos de ausência neste período;
- ✓ Ao meu pai Pedro Albuquerque, por todo incentivo de vida que me deu base para procurar sempre me aperfeiçoar;
- ✓ À minha família que cuidou dos meus filhos queridos quando precisei ficar ausente;
- ✓ Ao pesquisador Rui A. de Freitas pelos primeiros ensinamentos sobre taxonomia e identificação;
- ✓ À Francimeire Pinheiro que dedicou muitas horas de seu tempo para ensinar e realizar os testes de PCR;
- ✓ À Dra. Antonia M. Ramos Franco pela orientação e ensinamentos e paciência;
- ✓ À amiga Risonilce Souza, que me deu apoio nos momentos mais difíceis e, tão preciosamente, cuidou da minha filha na minha ausência. Além de todo apoio material e pessoal;
- ✓ Ao amigo Artêmio Coelho, que me acompanhou em todas as excursões, mesmo sem apoio financeiro;
- ✓ Aos colegas da CPCS, Roberto Dantas, Francisco Lima e Lourival Castro, por me acompanharem no trabalho de campo;
- ✓ Aos colegas da CPCS: Ana Cleide, Cândido, Paulo Edson, Francisco Batista e Maricleide, pela ajuda no andamento do trabalho;
- ✓ Aos queridos Raul Bernardes e Paulo Eduardo Albuquerque, que me acompanharam no início, mas que não puderam compartilhar comigo do final do meu trabalho. Que descansem em paz - *in memorium*;
- ✓ A todos os alunos do laboratório de Leishmaniose que me ajudaram de alguma forma;
- ✓ Aos professores do curso de Entomologia, Dras: Beatriz Teles, Rosaly Rocha, Neusa Hamada, Ana Pés e Dr. Márcio Oliveira que souberam compreender minhas necessidades e tão carinhosamente me ajudaram;
- ✓ À Lenir Mota, que me ajuda há muito tempo, e foi de grande valia durante o curso;

- ✓ Aos funcionários da Estação Experimental de Silvicultura Tropical do INPA, pela ajuda nos períodos de excursão até a Reserva de Campina;
- ✓ À Secretaria Municipal de Educação da Prefeitura de Manaus, por conceder licença para capacitação, me proporcionando mais tempo para me dedicar aos estudos;
- ✓ Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) que me deu a oportunidade de realização deste trabalho;
- ✓ À Kiara e Jackeline do Laboratório Temático de Genética pelo apoio nas fotografias dos géis;
- ✓ Aos alunos do Laboratório Temático de Genética, que, no anonimato, me ajudaram nas inúmeras vezes em que estive por lá;
- ✓ A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Epitáfio

*Devia ter amado mais
Ter chorado mais
Ter visto o sol nascer
Devia ter arriscado mais
E até errado mais
Ter feito o que eu queria fazer...*

*Queria ter aceitado
As pessoas como elas são
Cada um sabe alegria
E a dor que traz no coração...*

*O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar...*

*Devia ter complicado menos
Trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr
Devia ter me importado menos
Com problemas pequenos
Ter morrido de amor...*

*Queria ter aceitado
A vida como ela é
A cada um cabe alegrias
E a tristeza que vier...*

Sérgio Britto

Banca Examinadora

Dr Felipe Arley Costa Pessoa

Fundação Oswaldo Cruz – **Fiocruz**

Dra Joselita Maria Mendes

Coordenação em Pesquisas de Ciências da Saúde – **INPA**

Dr Jorge Arias

Centro de Controle de Doenças – Virgínia

Dr Sérgio Luis Bessa Luz

Fundação Oswaldo Cruz - **Fiocruz**

Dra Sônia Rolim Reis

Coordenação em Pesquisas de Ciências da Saúde – **INPA**

RESUMO

No período de 12 meses, entre setembro/2007 a agosto/2008, foram realizadas capturas de flebotomíneos utilizando armadilhas luminosas e isca animal (Disney) em uma área da Reserva Biológica de Campina, km 42 da BR 174, Manaus-Boa Vista. Foram capturados 1.842 insetos, sendo 1.297 fêmeas e 545 machos, distribuídos em 22 espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* França, 1924. A espécie encontrada em maior quantidade e distribuída em todas as áreas foi *Lutzomyia flaviscutellata* (85,7%), seguida por *L. georgii* (5,1%) e *L. olmeca nociva* (3,2%). As fêmeas de *L. flaviscutellata* foram as mais abundantes em todas as capturas, principalmente com armadilhas Disney na campina, sendo que os machos apresentaram maior densidade em coletas com armadilhas CDC, nas áreas de campina (59,2%), seguida pela campinarana (27,5%) e por último nas áreas de mata (13,2%). O estudo sazonal de *L. flaviscutellata* nestes ambientes mostrou maior densidade populacional no período de chuvas, verificando-se número mais elevado de fêmeas na campinarana no período compreendido entre fevereiro a abril. A diversidade de espécies foi variável de acordo com o método de captura e ambiente estudado. O índice de diversidade foi de 3,6 e nos três ambientes estudados representaram valores de 4,2 para mata, 1,5 campinarana e 1,1 para campina, verificando-se maior diversidade na área de mata, ao contrário do observado nas outras áreas. Realizaram-se exames para detecção de infecção natural por exame direto e pela técnica de PCR. A infecção por flagelados foi observada apenas pela nested PCR, tendo DNA amplificado de *Leishmania (Leishmania)* sp. em 11,7% (22/188) das fêmeas testadas pela reação. Os resultados deste trabalho corroboram para a compreensão da ecologia e epidemiologia dos vetores de leishmaniose na região do Amazonas, além de ser um dos pioneiros em estudos de fauna de flebotomíneos em áreas de mata de Campina no Brasil. O registro da predominância de *L. flaviscutellata* em um ambiente de poucos abrigos de animais e dificuldades quanto ao encontro da fonte alimentar sanguínea, sugere que esta espécie apresenta-se adaptada às condições adversas deste ambiente.

ABSTRACT

In the period of 12 months, between september/2007 to august/2008, in an area of the Biological Reserve of Campina, km 42 of the BR 174, Manaus – Boa Vista had been carried through captures of sandflies using CDC light traps and bait animal (Disney traps). 1,842 insects had been captured, being 1,297 females and 545 males, distributed in 22 species of the genus *Lutzomyia* França, 1924. The species found in bigger amount and distributed in all the areas was *Lutzomyia flaviscutellata*, (85.7%), followed for *L. georgii* (5.1%) and *L. olmeca nociva* (3.2%). The females of *L. flaviscutellata* had been the most abundant in all captures, mainly with Disney traps in the campina, being that the males had presented greater density in collections with light traps CDC, in the areas of campina (59.2%), followed for the campinarana (27.5%) and finally in the bush areas (13.2%). The sazonal study of *L. flaviscutellata* in these environments showed to greater population density in the period of rains, verifying itself number raised of females in the campinarana in the period understood between February the April. The species diversity was changeable in accordance with the method of capture and studied environment. The diversity index was of 3,6 and in three studied environments they had represented values of 4,2 for bush, 1,5 campinarana and 1.1 for campina, having verified itself bigger diversity in the bush area, in contrast of the observed one in the other areas. Examinations for detention of natural infection for direct examination and the technique of PCR had been become fulfilled. The infection for flagellates was observed only by nested PCR, having the DNA amplified of *Leishmania* (*Leishmania*) sp. in 11,7% (22/188) of the females tested for the reaction. The results of this work corroborate for the understanding of the ecology and epidemiology of the leishmaniasis vectors in the Amazon region, beyond being one of the pioneers in studies of sandflies fauna in areas of bush of Campina in Brazil. The register of the predominance of *L. flaviscutellata* in an environment of few shelters of animals and difficulties how much to the meeting of the sanguineous alimentary source, it suggests that this species is presented suitable to the adverse conditions of this environment.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Total de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* capturados durante o período de setembro de 2007 a agosto de 2008 na Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42. Manaus-AM..... 30
- Tabela 2. Distribuição das espécies de flebotomíneos capturadas com armadilhas tipo Disney e armadilha de luz tipo CDC, em diferentes ambientes na Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42 39
- Tabela 3. Levantamento de espécies de flebotomos utilizando-se armadilhas do tipo CDC e tipo Disney, em três ambientes (mata densa, campinarana e campina) na Reserva Biológica de Campina, BR 174, Km 42. Manaus-Am..... 40
- Tabela 4. Espécies de fêmeas de flebotomíneos identificadas e dissecadas para pesquisa de infecção natural por tripanosomatídeos..... 44
- Tabela 5. Total de fêmeas de flebotomíneos submetidas à Reação de PCR para detecção de infecção por tripanosomatídeos, capturadas em diferentes ambientes (mata densa, campinarana e campina) na Reserva Biológica de Campina. BR 174, km 42. Manaus-AM..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vista aérea da Reserva Biológica de Campina – BR 174, Manaus- Boa Vista. google earth	16
Figura 2	Área da Reserva Biológica de Campina. BR 174, km 42, Manaus-Boa Vista/Brasil. Coelho, Artêmio. 2009.....	19
Figura 3	Perfil da estrutura vegetal da campinarana da Reserva Biológica do INPA (Anderson <i>et al.</i> , 1975).....	20
Figura 4	Diferentes ambientes da Reserva Biológica de Campina. INPA. (a) área de mata; (b) campina (c) campinarana.....	21
Figura 5	Armadilhas para captura de mamíferos. (a) Modelo Tomahawk (50 x 20 x 20 cm) e (b) Sherman (mod. LFATDG 23 x 8 x 9 cm).....	22
Figura 6	Métodos de coleta/captura de flebotomíneos. (a) Armadilha luminosa do tipo CDC e (b) armadilha Disney contendo um preá (<i>Cavia aperea</i>) no interior de uma gaiola.....	23
Figura 7	Proporção de machos e fêmeas de flebotomíneos coletados na área de Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42, Manaus, AM.....	31
Figura 8	Abundância de espécies do gênero <i>Lutzomyia</i> capturadas com armadilha luminosa, em três ambientes na área de Reserva Biológica de Campina, AM, Brasil. (a) Espécies mais abundantes; (b) Todas as outras espécies.....	32
Figura 9	Número total de flebotomíneos capturados por ambiente e tipo de armadilha, na Reserva Biológica de Campina, INPA, Manaus, AM.....	35
Figura 10	Total de flebotomíneos da espécie <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> capturadas por tipo de armadilhas e ambientes distintos.....	35
Figura 11	Total de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em três ambientes com armadilha luminosa do tipo CDC: (a) todos os espécimes de flebotomíneos capturados e (b) apenas da espécie <i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	36
Figura 12	Total de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em	

	três ambientes por armadilha Disney. (a) todos os espécimes de flebotomíneos capturados e (b) apenas <i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	37
Figura 13	<i>Marmosa</i> sp. (Marsupialia: Didelphidae) capturada com armadilha Sherman na Reserva Biológica de Campina, INPA, AM-BR.....	38
Figura 14	Distribuição mensal de <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> por ambiente, capturadas com armadilha luminosa (CDC) na Reserva Biológica de Campina, Manaus, AM (a) mata densa; (b) campinarana e (c) campina.....	42
Figura 15	Distribuição mensal de <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , capturada com armadilha luminosa (CDC) e Disney na Reserva Biológica de Campina, Manaus, AM.....	43
Figura 16	Detecção de infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> , Gel de agarose a 2% com os produtos de amplificação da região de mini-exon pela Ln – PCR. Amostras amplificadas/nº posição no gel): <i>L. (Viannia) guyanensis</i> – 242 pb (1); <i>L. (Leishmania) amazonensis</i> 302 pb (2); <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> (3, 4, 5, 6 e 9); <i>Lutzomyia georgii</i> (7); <i>L. olmeca nociva</i> (8). Marcador de peso molecular (10).....	46
Figura 17	Detecção de infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> , Gel de agarose a 2% com os produtos de amplificação da região de mini-exon pela Ln – PCR. Amostras amplificadas/nº posição no gel: <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (3); <i>L. (Leishmania) amazonensis</i> (4); <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> (5 – 13, 15-17); <i>L. olmeca nociva</i> (14), <i>L. georgii</i> (18); controle negativo H ₂ O (2), peso molecular (1). Modificada para melhor visualização.....	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Ficha de dissecação.....	70
Anexo 2	Reação de PCR.....	71
Anexo 3	Listagem de indivíduos capturados na área da Reserva Biológica de Campina.....	72
Anexo 4	Denominação das espécies segundo classificação dos autores Young e Duncan (1994) e Galati (1995).....	73
Anexo 5	Preferência alimentar e habitat das espécies capturadas na Reserva Biológica de Campina.....	74

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
EPÍGRAFE.....	v
BANCA EXAMINADORA.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xii
SUMÁRIO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Fauna de flebotomíneos.....	02
1.2- A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	05
1.3- Mamíferos reservatórios.....	10
1.4- Campinas amazônicas.....	11
1.5- Aplicação da reação de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) para a detecção da infecção natural.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1- Área de coleta.....	15
3.2- Tipos de coletas/capturas	18
3.3- Captura e exame de mamíferos.....	18
3.4- Coleta de flebotomíneos.....	22
3.5 Triagem e identificação de flebotomíneos.....	23
3.6- Detecção de taxa de infecção natural.....	24
3.6.1- Dissecção e isolamento de flagelados.....	24
3.6.2- Detecção Utilizando a Análise Molecular.....	25
3.7- Análise de dados.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Riqueza de espécies.....	28

4.2	Abundância relativa.....	29
4.3	Distribuição de espécies de acordo com o ambiente.....	29
4.4	Distribuição das espécies de acordo com o tipo de captura.....	33
4.5	Exame de animais capturados.....	38
4.6	Distribuição sazonal.....	41
4.7	Taxa de infecção natural por tripanosomatídeos.....	41
4.8	Animal sentinela.....	47
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8.	ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos têm sido bem estudados e registrados na literatura em todo o mundo. No Brasil são relatados vários estudos (Arias *et al.*, 1977; Ryan, 1986; Castellón *et al.*, 1989; Barrett *et al.*, 1996; Fé *et al.*, 1998; Dias-Lima *et al.*, 2000, 2003; Brandão-Filho, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Feitosa *et al.*, 2004), principalmente para esclarecer a ecologia das leishmânias, que são os principais parasitos transmitidos por esses insetos. O estudo dos flebotomíneos tem como vantagens o interesse médico e epidemiológico já que estes são vetores de doenças. Além das leishmânias, são hospedeiros de bactérias, fungos, determinadas espécies de plasmódios, hemogregarinas, tripanosomas e endotrípanos (Christensen e Herrero, 1979; Warburg, 1991; Shaw, 1992).

São conhecidas, aproximadamente 800 espécies, sendo 60% na Região Neotropical. No Brasil, tem-se conhecimento de 230 espécies, representando 30% do total e, aproximadamente, 50% das que ocorrem na Região Neotropical (Rangel e Lainson, 2003).

Estes insetos são de pequeno porte, apresentando o corpo densamente piloso, constituído principalmente por cerdas finas e longas, e coloração clara ou amarelada até cores mais escuras. Algumas espécies são capazes de transmitir aos vertebrados diversos patógenos, dentre estes, protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) causadores das leishmanioses, por meio da picada dos flebotomos em busca de repasto sanguíneo (Rangel e Lainson, 2003). A doença atinge, principalmente, indivíduos do sexo masculino em fase produtiva, em decorrência de atividades ocupacionais relacionadas aos desmatamentos, garimpos e exercícios militares (Marzochi, 1992).

Estudos com flebotomíneos capturados em áreas de mata densa, na Amazônia, têm sido extensamente relatados e descritos na literatura. Porém, são poucas as pesquisas relacionadas a esta fauna e à circulação de espécies de leishmânias em áreas de campina/campinarana, o que justificou a realização deste levantamento realizado na Reserva Biológica de Campina do INPA. Trabalho pioneiro foi realizado, nesta Reserva em 2006 por Silva *et al.*, dados não publicados. Essas áreas apresentam-se como pequenas manchas com formação vegetal

arbustiva-arbórea-graminóide, dentro da extensa mata densa, que constitui a floresta amazônica.

Tripanosomatídeos têm sido isolados de várias espécies de flebotomíneos, entretanto, não se conhece os prováveis transmissores de diversas espécies de parasitas, o que tornou interessante investigar o ciclo biológico destes organismos, em especial, nestas áreas de campina e campinarana. Desta forma, concomitante ao levantamento de flebotomíneos realizou-se um estudo da infecção natural por representantes da família Trypanosomatidae existentes em área de campina e campinara da Reserva do INPA, na tentativa de contribuir para o conhecimento da fauna destes insetos em áreas ainda pouco estudadas e sem alterações ambientais decorrentes da urbanização e de outros fatores externos.

1.1. Fauna de flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Rangel e Lainson 2003). Segundo Young e Duncan (1994) são reconhecidos três gêneros no Novo Mundo: *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França e Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948; e três no Velho Mundo: *Phlebotomus* Rondanii, 1840; *Sergentomyia* França e Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987.

Dentre os três gêneros de flebotomíneos encontrados no continente americano, o gênero *Brumptomyia* inclui 23 espécies que são distribuídas do sul do México ao norte da Argentina (Martins *et al.*, 1978; Galati e Cárceres, 1999). Nove dessas espécies têm sido observadas picando o homem. Nove espécies de *Warileya* têm sido implicadas na transmissão de doenças, mas pouco se conhece sobre sua relação com patógenos humanos. O gênero *Lutzomyia* contém a maioria dos flebotomíneos das Américas com cerca de 400 táxons descritos (Young e Duncan, 1994). Após os registros de Young e Duncan, mais de uma dezena de espécies têm sido descritas até a data atual.

O gênero *Lutzomyia*, considerado o de maior importância médica por conter espécies transmissoras de patógenos humanos no Novo Mundo, possui ampla distribuição no Brasil desde regiões do sul até áreas do norte do país.

Somente 32 espécies de flebótomos têm sido implicadas na transmissão de leishmanioses para humanos. Em contraste, uma ampla variedade de mamíferos silvestres e domésticos está envolvida como reservatório de espécies de *Leishmania* (Grimaldi e Tesh, 1993).

Diversas investigações sobre a fauna de flebotomíneos foram feitas nos estados da região norte (Martins *et al.*, 1965; Arias e Freitas, 1978; Ready *et al.*, 1986; Castellón *et al.*, 1991; Freitas e Barrett, 1999; Araújo *et al.*, 2000; Andrade-Filho *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2007), colaborando com o conhecimento da distribuição, abundância e biologia de diversas espécies vetoras e suspeitas de transmitirem a leishmaniose.

O modo de transmissão é através da picada de fêmeas de dípteros, onde somente dois gêneros são realmente importantes para a epidemiologia das leishmanioses no Mundo: *Lutzomyia*, que são os vetores das Américas e *Phlebotomus* que são os transmissores de leishmaniose na África, na Europa e na Ásia. Nas Américas, existem aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* ssp. podendo existir mais espécies de vetores ainda não identificadas (Lainson e Shaw, 1998).

Esses insetos apresentam uma grande diversidade de habitats, sendo encontrados em regiões semi-áridas, florestas, áreas serranas, chegando até áreas urbanas. Possuem hábitos crepusculares ou noturnos e costumam permanecer em seus abrigos durante as horas luminosas do dia, abandonando-os no período crepuscular em busca de alimento (Forattini, 1973). Contudo, *L. wellcomei* e *L. umbratilis*, vetores de leishmanioses na Amazônia, frequentemente atacam o homem durante o dia (Lainson *et al.*, 1994). Sua classificação baseia-se nos caracteres dos adultos machos e fêmeas. Dos três gêneros do Novo Mundo *Lutzomyia* é considerado o mais importante por conter representantes vetores da leishmaniose. Nas Américas, têm sido descritas cerca de 400 espécies deste gênero, sendo que mais da metade é registrada no Brasil (Young e Duncan, 1994).

Os flebótomos são holometabólicos, tendo as formas imaturas o habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os abrigos dos adultos variam de acordo com o micro-habitat, estação do ano, umidade relativa do ar e de acordo com a espécie, sendo encontrados em tocas de animais silvestres, ocos de árvores, cavernas, fendas nas rochas e, sobretudo, locais com bom teor de umidade, matéria orgânica

em decomposição, pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar, ou seja, em locais que os protejam da dessecação (Rangel e Lainson, 2003; Forattini, 1973). São conhecidos vulgarmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui, asa branca, asa dura, frebóti e cangalhinha dependendo da região onde são encontrados. Possuem asas com ponta em forma de lança, mantidas eretas sobre o corpo durante o pouso. Os adultos de ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte de energia, retirando-os do néctar de flores, frutos e/ou de seivas de plantas e secreções de afídeos. As fêmeas, entretanto, apresentam o hábito de sugar o sangue de vertebrados, necessário à maturação de seus ovos (Young e Duncan, 1994). Essa característica os inclui em um grupo de importância epidemiológica. O hematofagismo é precedido da injeção ou inoculação de saliva que pode desencadear reações alérgicas. Ao sugar o sangue humano, esses insetos injetam, através da pele, vários microrganismos patógenos podendo transmitir determinadas infecções ao homem causando-lhe doenças como a leishmaniose, bartonelose e algumas arboviroses (Forattini, 1973; Pessoa e Martins, 1982; Corn *et al.*, 1990). Esses insetos são hospedeiros, além das leishmânias, de bactérias, fungos, determinadas espécies de plasmódios, hemogregarinas, tripanosomas e endotrípanos (Christensen e Herrer, 1979; Warburg, 1991; Shaw, 1992; Franco, 1995).

Têm ampla distribuição: a maioria das espécies vive em florestas primárias, atacando o homem e os animais domésticos quando estes nelas penetram, ou quando suas moradias estão localizadas no interior ou na vizinhança das mesmas; algumas espécies vivem em associação íntima com o homem e os animais domésticos, enquanto que outras vivem em habitats mais ou menos afastados de suas habitações. Certas espécies vivem de preferência em floresta secundária, mas podem frequentar habitações humanas e de animais domésticos situados em suas proximidades (Barretto, 1943).

Ready *et al.* (1985), verificaram que *Lutzomyia umbratilis* Ward e Fraiha, 1977, a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão de *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954, durante a noite se localiza nas copas das árvores e durante o dia é geralmente encontrado em troncos de árvores, atacando o homem ao ser perturbado.

Lainson e Shaw (1972) descreveram que *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva*, vetores de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* têm hábitos noturnos, voo baixo e são pouco antropofílicos.

1.2- A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

As leishmanioses são zoonoses causadas por várias espécies de protozoários representantes do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), largamente distribuídos por quase todo o hemisfério Ocidental e Oriental. É uma doença crônica e não contagiosa, que acomete o homem e algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, dos quais alguns se constituem como reservatórios, sendo considerada a segunda doença causada por protozoário de maior incidência na Amazônia, constituindo um grande problema de saúde pública na região (Marcondes, 2001).

Atualmente, as leishmanioses são notificadas em quatro continentes e endêmicas em 88 países, 72 destes em desenvolvimento. O Brasil é um dos países de maior incidência da doença, tanto na forma visceral como na cutânea. As infecções são causadas por diversas espécies do parasito, com seus ciclos biológicos distintos envolvendo dois hospedeiros, um vertebrado, geralmente mamífero silvestre e um invertebrado, insetos do gênero *Lutzomyia*. Nas Américas, o homem participa como hospedeiro acidental, apresentando manifestações clínicas graves como lesões destrutivas da pele, mucosas e órgãos internos. Dados do Departamento de Informática do SUS (DATASUS), apresentam registros no período de 1999 a 2003, de cerca de 33.872 casos de leishmaniose tegumentar americana por ano no Brasil. A Região Norte apresentou maior número, com 61.339 no período descrito, e taxas de incidência por 100 mil habitantes entre 114,8 e 163,5, para a Região Norte. No Amazonas, foram registrados 12.005 casos para o mesmo período, com taxas médias de incidência de 86,77, sendo que no ano de 2003 esta taxa foi de 121,03 com 3.174 casos, 60,18% no Município de Manaus (Ministério da Saúde, 2005). Esses casos são procedentes, principalmente dos assentamentos populacionais das estradas BR 174 e AM 010 e ocupações desordenadas da periferia do município (Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 2005). Sendo

L. umbratilis incriminado como o principal transmissor de *L. (V.) guyanensis* ao norte do Rio Amazonas (Lainson *et al.*, 1976; Ward e Fraiha, 1977; Arias e Freitas, 1977, 1978; Ready *et al.*, 1986).

É provável que a distribuição das espécies de *Leishmania* seja mais ampla que a conhecida, pois em geral esta é baseada apenas em dados de registro de casos humanos (Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi *et al.*, 1989; Kawa e Sabroza, 2002).

A ordem Kinetoplastida, filo Protozoa, caracteriza-se por apresentar mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Esta organela localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo.

As leishmânias são parasitos digenéticos, completando seu ciclo biológico em dois hospedeiros. No inseto vetor, o protozoário se apresenta sob as formas com flagelo livre, paramastigota (que se fixa ao epitélio de revestimento do trato digestório) e promastigota (estágio posterior que após modificação de sua estrutura e morfologia migram para a porção anterior do vetor). Para alguns autores (Walters *et al.*, 1989; Rojas *et al.*, 1995), formas como as nectomonas e haptomonas podem ser encontradas no trato digestório durante o desenvolvimento e diferenciação no inseto. Enquanto no hospedeiro vertebrado aparece no interior de macrófagos ou livre no espaço intersticial, sob a forma amastigota, com flagelo rudimentar (Vásquez *et al.*, 2002); se multiplicando por divisão binária e clonal. A diversidade biológica encontrada no gênero ocorre devido a mutações e/ou trocas genéticas entre organismos, através de fusão celular (Souza *et al.*, 1997) e de parasitos híbridos (Delgado *et al.*, 1997; Jamjoom *et al.*, 2004; Schwenkenbecher *et al.*, 2004). Embora haja evidências da existência de reprodução sexual, não se sabe com qual frequência esta ocorre (Cupollilo *et al.*, 1994,1998; Bañuls *et al.*, 1999c).

Existem pelo menos oito espécies de *Leishmania* descritas e que são associadas com a doença humana, sendo que no Brasil *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas (Grimaldi *et al.*, 1989). As principais espécies de leishmânias pertencem a dois subgêneros: *Viannia*, que inclui espécies do complexo *braziliensis* e *Leishmania*, que inclui espécies do complexo *mexicana* (Lainson e Shaw, 1998). Até o momento, sete espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA:

a) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw, 1972: distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), especialmente em áreas de igapó e de mata de várzea. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás) (Marzochi, 1992; MS/FUNASA, 2000). A doença humana pode ocorrer como lesão cutânea ulcerada, geralmente única. Alguns indivíduos podem desenvolver um quadro clássico de leishmaniose cutânea difusa caracterizada por infiltrações, pápulas e tubérculos, envolvendo extensas áreas cutâneas. Esta forma da doença, até o momento, é apenas controlável sem, entretanto, ocorrer a cura (Marzochi, 1992; MS/FUNASA, 2000). Seus principais vetores são *L. flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. o. nociva*, que são pouco antropofílicos (Lainson e Shaw, 1972). Tem como hospedeiros naturais vários marsupiais, principalmente o roedor “rato-soiá” (*Proechymis*), além do *Oryzomys* (Lainson e Shaw, 1998).

b) *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954: aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), é encontrada principalmente em florestas de terra firme. Vários mamíferos silvestres foram identificados como hospedeiros naturais: a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais e roedores (Lainson e Shaw, 1987). A doença humana é caracterizada por lesões únicas ou múltiplas. As lesões múltiplas são consequência de picadas simultâneas do vetor *L. umbratilis* bastante antropofílico. No entanto, raramente ocorre comprometimento mucoso (MS/FUNASA, 2000; Rey, 2001).

c) *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira *et al.*, 1987 : encontrada apenas na região amazônica, tem como possível reservatório natural o roedor *Agouti paca* (Silveira *et al.*, 1991b); e como vetor, *L. ubiquitalis* (Silveira *et al.*, 1991a ; Lainson *et al.*, 1992). O parasito causa lesões cutâneas simples.

d) *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson e Shaw, 1989 : ocorre nos Estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu *Dasyus novemcinctus* como reservatório. O parasito causa lesões simples ou ulceradas que geralmente evoluem para cura. Seus principais vetores são *L. squamiventris* (Lainson e Shaw, 1989).

e) *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson *et al.*, 1989: responsável por casos humanos no Amazonas e Pará. Tem como reservatórios macacos (*Cebus apella* e *Chiropotes satanas*), preguiças (*Choloepus dadactylus* e *Bradypus tridactylus*) e a

cotia (*Nasua nasua*). A *L. whitmani* tem sido associada como o vetor envolvido. O parasito causa geralmente lesões cutâneas simples (Lainson *et al.*, 1989).

f) *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911: tem ampla distribuição, do Sul do Pará ao Sudeste, atingido também o Centro Sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Em áreas de colonização antiga, onde o ambiente se encontra profundamente modificado, a *L. (V.) braziliensis* é o agente mais frequentemente associado à LTA. (Marzochi, 1992; Brandão-Filho, 2001; Shaw e Lainson, 1987). A doença humana é caracterizada por úlcera única ou múltipla cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica para a mucosa da nasofaringe, com destruição desses tecidos. A ocorrência desta complicação vem sendo reduzida, não excedendo a 3% dos casos em áreas endêmicas conhecidas. Esta redução estaria associada provavelmente ao diagnóstico e tratamento precoces (MS/FUNASA, 2000; Marzochi, 1989).

g) *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira *et al.*, 2002: Foi descrita a partir de infecções em soldados em treinamento na reserva florestal no Estado do Pará. Não existem relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A espécie incriminada como provável transmissora é a *L. (Nyssomyia) antunesi*, que é comumente encontrada atacando o homem nesta localidade (Silveira *et al.*, 2002). Causa lesões cutâneas localizadas, não sendo detectada nenhuma lesão mucosa até o momento. A *L. (V.) lindenbergi* é diferente dos outros membros do subgênero *Viannia* por seus perfis de enzima e aos testes com anticorpos monoclonais. Está relacionada à *L. (V.) naiffi* e, igualmente, produz uma infecção inaparente na pele de animal experimental (hamster).

A LTA é uma doença que apresenta variável grau de comprometimento da saúde humana e se manifesta por diferentes formas clínicas, incluindo as formas cutâneas únicas ou múltiplas (forma disseminada), a forma cutâneo-difusa e a apresentação na forma mucosa (espúndia), com o comprometimento do trato respiratório superior, particularmente o septo nasal, caracterizando-se pelo aparecimento de edema, hiperemia, ulceração e necrose, com risco de ocorrência de deformidades (Marsden, 1986).

De acordo com a distribuição das diversas espécies de flebotomíneos envolvidos na sua transmissão, a LTA assumiu características epidemiológicas distintas no Brasil. Nas décadas de 30 e 40, durante o processo de colonização das regiões Sul e Sudeste, a transmissão esteve associada aos vetores *L. whitmani*, *L.*

peessoai e *L. migonei*, de comportamento silvestre. Atualmente nestas regiões, que coincidem com a distribuição da Mata Atlântica, o vetor fortemente suspeito é a *L. intermedia* (Marzochi, 1989).

A LTA apresenta nos últimos anos um processo de expansão em todas as regiões do Brasil, tanto em áreas notoriamente endêmicas, como incidência em novas áreas. Caracteriza-se não só pelo aumento expressivo no número de casos, mas também por apresentar uma importante difusão espacial (Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Brandão-Filho e Shaw, 1994; Lainson e Shaw, 1998; Brandão-Filho *et al.*, 1999), chamando atenção para o crescente registro de casos em áreas de ocupação antiga, inclusive em áreas peri-urbanas. Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia, às formas clínicas associadas e ao padrão de transmissão envolvido, impondo novas questões e desafios para o planejamento de programas e estratégias de controle (Marzochi, 1989).

Deve ser destacado que no ciclo de transmissão zoonótico são agregadas áreas com características ecológicas distintas, que parecem configurar situações particulares na transmissão e manutenção da endemia: aquelas associadas à derrubada das matas para a construção de estradas e instalações de povoados em regiões pioneiras, a exploração desordenada da floresta, como a derrubada de matas para extração de madeira, agricultura, pecuária, entre outras; áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura vegetal conservada, com possibilidade de exposição eventual do indivíduo ao vetor e parasita neste ambiente restrito e, finalmente, áreas nas quais o processo de urbanização acarretou a criação das condições favoráveis à produção de surtos endêmicos na periferia de cidades e povoados (MS/FUNASA, 2000; Kawa e Sabroza, 2002).

O padrão epidemiológico predominante nas primeiras décadas do século XX foi o de uma zoonose de transmissão silvestre, que atingia o homem quando da sua presença nos ambientes florestais. O crescente desaparecimento das florestas deu lugar ao aparecimento do fenômeno da domiciliação de vetores, alterando a condição de exposição do homem ao parasita. A circulação dos agentes causais em ambientes fora dos limites geográficos dos focos naturais é crescente e induz ao aparecimento de mudanças dos perfis clássicos da doença. Outro fator determinante da exposição do homem é a expansão demográfica, no qual o processo de urbanização vem ocorrendo próximos das áreas dos focos naturais (Gomes, 1992).

1.3- Mamíferos reservatórios

Os reservatórios naturais dos parasitas causadores da LTA são os rodentia, marsupialis, edentados, procionídeos e primatas (macacos) além de animais domésticos como canídeos e equinos (Marcondes, 2001). Dentre os edentados destacamos as preguiças de dois dedos (gênero *Choloepus* Illiger, 1811) e três-dedos (gênero *Bradypus* Linnaeus, 1758) com distribuição pela América do Sul e Central (Wetzel e Ávila-Pires, 1980). Esses edentados podem ser encontrados naturalmente infectados por diversos hemoflagelados da família Trypanosomatidae, num total de seis espécies de leishmanias: *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954; *L. shawi* Lainson *et al.*, 1989; *L. panamensis* Lainson e Shaw, 1972; *L. herreri* Zeledon, Ponce e Murillo, 1979; *L. equatorensis* Grimaldi *et al.*, 1992; *L. colombiensis* Kreutzer *et al.*, 1991; duas de endotrípanos: *E. schaudinni* Mesnil e Brimont, 1908 e *E. monterogeii* Shaw, 1969; além de seis tripanosomas: *T. cruzi* Chagas, 1909; *T. leeuwenhoecki* Shaw, 1969; *T. mesnilbrimonti* Deane, 1961; *T. preguici* Shaw, 1969; *T. rangeli* Tejera, 1920 e *T. legeri* Mesnil e Brimont, 1910 (Franco, 1995; Franco *et al.*, 1999). Talhari *et al.* (1988) afirmam que em *Choloepus didactylus* (preguiça real) as taxas de infecção por *Leishmania* chegam a 90% nas regiões próximas a Manaus.

Trabalhos como de Christensen *et al.* (1982), examinando flebotomíneos capturados em áreas endêmicas de LTA na região amazônica mostraram por meio do método de precipitina que 64% das fêmeas de *L. umbratilis* tinham se alimentado em preguiças. Um total de 33% dos espécimens foi positivo para anti-soro gênero-específico de *Choloepus* sp., indicando que *Choloepus didactylus* constituía a fonte principal de repasto para esta espécie de flebótomo. Das fêmeas do grupo *shannoni* (*L. shannoni*, *L. dendrophylla*, *L. scaffi* e *L. abbonenci*), 73% haviam se alimentado também preferencialmente do sangue de preguiças, verificando-se a importância desses animais como fonte alimentar, assim como, seu provável envolvimento em diversos ciclos de transmissão.

1.4- Campinas amazônicas

As áreas de campina e campinarana apresentam aspectos fisionômicos bem distintos, em comparação com as florestas altas de terra firme. Elas são características em relação à sua estrutura vegetal. Enquanto a mata densa se caracteriza por árvores altas formando um dossel virtualmente fechado, a vegetação das campinas é baixa e com muitas manchas abertas, apresentando solos arenosos, com drenagem excessiva que dificultam a fixação de nutrientes e em algumas áreas não possuem camada orgânica (Anderson *et al.*, 1975).

As teorias supõem que existem um ou mais fatores que restringem o crescimento e/ou a sobrevivência dos organismos, devido a essa drenagem excessiva, e mudanças nestes fatores levam a diferentes caminhos para a composição da comunidade. Ao mesmo tempo, cada organismo realiza funções peculiares que também alteram o ambiente. Tomando como exemplo os ciclos de nutrientes, vê-se que as espécies podem apresentar efeitos e ritmos diferenciados no ciclo de determinados elementos, o que significa que a composição das espécies poderia determinar os tipos de processos principais e a sua velocidade na comunidade.

1.5- Aplicação da reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção da infecção natural

Normalmente, a detecção e diagnóstico de infecções por parasitas baseiam-se em diversos métodos observando sintomas clínicos, história clínica, história de viagem e localização geográfica do paciente. Cada método diagnóstico tem vantagens e desvantagens inerentes. As maiores vantagens das técnicas de detecção baseadas no ácido nucléico são: sua sensibilidade para detecção de patógenos; a velocidade com a qual podem identificar o DNA de um organismo; o processamento de um grande número de espécimes com um ensaio automatizado; serem independentes de se conhecer a imunocompetência ou história clínica prévia; permitir distinguir entre organismos que são morfologicamente similares; e permitir

evidenciar organismos, mesmo os que não são viáveis ou cultiváveis (Uliana, 1991; Piarroux *et al.*, 1993).

Têm sido descritos ensaios de reação da polimerase em cadeia (PCR) que apresentam boa especificidade e sensibilidade para a detecção de *Leishmania* sp., usando métodos simples e eficientes de preparo de amostras e detecção. De 63 biópsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas e mucocutâneas analisadas em estudo de campo no Peru, a PCR resultou em mais amostras positivas que os métodos diagnósticos convencionais (Weiss, 1995).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são unicelulares dimórficos e apresentam como característica uma organela celular denominada cinetoplasto, que é composta, basicamente, por moléculas de DNA agrupadas. O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa a informação genética mitocondrial desses parasitos. É constituído por maxicírculos e minicírculos, moléculas que se concatenam formando uma rede compacta. Os minicírculos representam 95% da massa de kDNA. As moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero. Os minicírculos são bons substratos para sondas moleculares (Simpson *et al.*, 1980; Degrave *et al.*, 1994).

Para se avaliar a taxa de infecção natural nos flebotomíneos, o método mais comumente utilizado para investigação é o laboratorial, com o exame do parasito *in loco*, depois da dissecação do trato digestório do inseto, no entanto, este tipo de metodologia é, na maioria das vezes, penoso e demorado, pois torna-se necessária a dissecação de um grande número de fêmeas (Tesh *et al.*, 1984). Devido a isso, ensaios para a detecção de *Leishmania*, têm sido desenvolvidos baseados na amplificação de vários alvos do DNA, tais como: a região de minicírculo do kDNA (Rodgers *et al.*, 1990; Aransay *et al.*, 2000), o gene rRNA (Guevara *et al.*, 1992), gene de mini-exon ou “spliced leader RNA gene” (Hassan *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 1994; Agami *et al.*, 1994; Katakura *et al.*, 2003) e sequências repetidas do DNA (Piarroux *et al.*, 1993).

O gene de mini-exon ou “spliced leader RNA gene” está presente em todos os parasitos da família Trypanosomatidae, incluindo os gêneros que infectam vertebrados: *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*, mas ausente nos hospedeiros mamíferos e flebótomos (Katakura *et al.*, 1998: 2003). Este gene,

encontra-se como sequências repetitivas de 100-200 cópias no genoma nuclear dos parasitos (Sturm e Campbell, 1999; Yu *et al.*, 2002; Katakura *et al.*, 2003).

Segundo Santana *et al.* (2001) e Sturm *et al.* (2001), os 39 nucleotídeos presentes na seqüência de mini-exon nos kinetoplastídeos, são altamente conservados na posição 1-9 e 21-39, com variações mínimas, tornando-se assim, um excelente marcador molecular (Murthy *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1993; 1994; 1998; 1999 e 2001; Katakura *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1998; Grisard *et al.*, 2000; Kebede *et al.*, 1999).

Relevantes contribuições para o aperfeiçoamento da técnica da PCR na investigação de leishmânia foram dadas por Katakura *et al.* (1998) trabalhando com diagnóstico em paciente com Leishmaniose Visceral na China, no período de 1998. Os autores desenvolveram a técnica do “Nested PCR”, baseado na amplificação do gene de mini-exon. Esta técnica foi suficientemente sensível para a detecção do DNA de leishmânia quando os parasitos encontravam-se em baixa concentração. A “Nested PCR”, melhora a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente (1ª reação), copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois utilizado este primeiro produto, para a amplificação da real sequência-alvo (2ª reação). Estas duas etapas podem ser realizadas concomitantemente, ou em duas reações separadamente (Katakura *et al.*, 1998; Noyes *et al.*, 1998; Aransay *et al.*, 2000).

Estudos recentes apontam a PCR como uma metodologia molecular de grande relevância para a pesquisa da infecção de *Leishmania* sp. em reservatórios e flebotomíneos (Paiva *et al.*, 2006)

Pinheiro (2004), analisando a taxa de infecção natural em *L. umbratilis* em áreas endêmicas de LTA, através da nested-PCR (Ln-PCR), fez uso de iniciadores que discriminam subgêneros de *Leishmania* a partir do tamanho do produto amplificado, comparando os resultados deste método, com a clássica metodologia de dissecação e observação do trato digestório, com o objetivo de avaliar a taxa de infecção natural analisando-se a eficiência das duas técnicas. Os resultados desta investigação contribuíram para o conhecimento e aplicação de métodos moleculares para a epidemiologia da leishmaniose e o estudo dos vetores na região do Amazonas, Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Realizar levantamento da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e taxa de infecção natural por tripanosomatídeos em áreas de campina/campinarana e mata densa na Reserva Biológica de Campina do INPA.

2.2- Objetivos específicos:

- ▶ Realizar levantamento das espécies de flebotomíneos no período de um ano na área de campina/campinarana da Reserva Biológica do INPA, Manaus – AM;
- ▶ Comparar a fauna de flebotomíneos em diferentes ambientes: campina, campinarana e mata densa de terra firme, na Reserva Biológica do INPA, Manaus – AM;
- ▶ Verificar a ocorrência de vetores das leishmanioses na área de estudo;
- ▶ Analisar a fauna flebotomínica nos diversos ambientes com métodos diferenciados de coleta;
- ▶ Detectar a circulação de protozoários do gênero *Leishmania*.
- ▶ Isolar protozoários do gênero *Leishmania*;
- ▶ Verificar a taxa de infecção natural dos flebotomíneos dissecados;
- ▶ Identificar DNA parasitário em flebotomíneos pela técnica de Nested-PCR (Ln-PCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Área de coleta

A Reserva Biológica de Campina (Figura 1 e 2) está situada no Km 42 da Rodovia BR-174 Manaus/Boa Vista, (82° 93' 97"S e 97° 12' 19"W) possui 900 ha, sendo de tamanho relativamente pequeno, se comparada com outras reservas brasileiras. Abriga um ecossistema típico de campina com formação vegetal arbustiva-arbórea-graminóide diferindo bastante da floresta amazônica. É localizada sobre um solo podzólico, sendo este ecossistema representativo da área de influência do rio Negro, com deficiência de nutrientes minerais e biologicamente empobrecidos (Klinge, 1965).

Apesar de seu tamanho, esta área apresenta considerável variação em termos de cobertura vegetal. Em alguns lugares há espaços abertos de areia branca, com pequenas ilhas dispersas de vegetação variável, compostas de subarbustos e árvores pequenas, com aproximadamente cinco metros de altura. Próximo a estes espaços podem ocorrer ilhas de vegetação maiores e mais densas, com árvores que podem alcançar sete metros ou mais, progredindo até uma área de transição onde as árvores são mais altas, ultrapassando a 10 metros, formando um dossel mais ou menos contínuo, passando a formar a campinarana (Figura 3). A transição da campinarana para a mata densa é brusca e o limite entre os dois tipos de vegetação é geralmente bem definido (Anderson *et al.*, 1975).

Devido a essa variação na cobertura vegetal, torna-se necessário dividi-la em subtipos descritivos. A área chamada de campina apresenta-se com vegetação que ocorre em grupos perfeitamente distintos, formando ilhas ou penínsulas, cercadas ou próximas de áreas relativamente abertas em solo arenoso descoberto. As árvores mais altas nunca chegam a atingir a altura de 10 m de altura. Apresenta ainda duas áreas distintas: **campina aberta** e **campina fechada**. A campina aberta é composta por um estrato superior baixo de subarbustos de até 2 m de altura, e arbustos e árvores pequenas de até 5 m de altura. Isto forma um ambiente aberto com muita luz. Predominam nesses locais espécies de *Sandemania hoehnei* (Cogn.) Wurdack, *Atayba opaca* Radlk., *Conomorpha* cf. *grandiflora* Mez e *Eugenia* spp.

Nestas pequenas ilhas, depósitos de matéria orgânica e húmus são gradativamente construídos formando uma manta vegetal característica (Anderson *et al.*, 1975). A campina fechada apresenta vegetação estruturalmente mais diversificada e em certos lugares é dominada por lotes quase puros de indivíduos de *Glycixylon inophyllum* (Mart. ex Miq) Duck de mesma idade. Predominantemente a vegetação consiste de uma diversidade de espécies de tamanhos diferentes, chegando a 7m de altura, que resulta em uma estrutura heterogênea, com árvores curvadas e tortas, e o dossel é um emaranhado de ramos tortuosos, entremeando-se com epífitas. Predominam neste lugar, além de *Glycixylon inophyllum* (Mart. ex Miq) Duck, *Aldina heterophylla* Spr. Ex. Benth *Ouratea spruceana* Engl. *Swartzia dolycopoda* Cowan e *Eugenia* sp. (Braga e Braga, 1975).

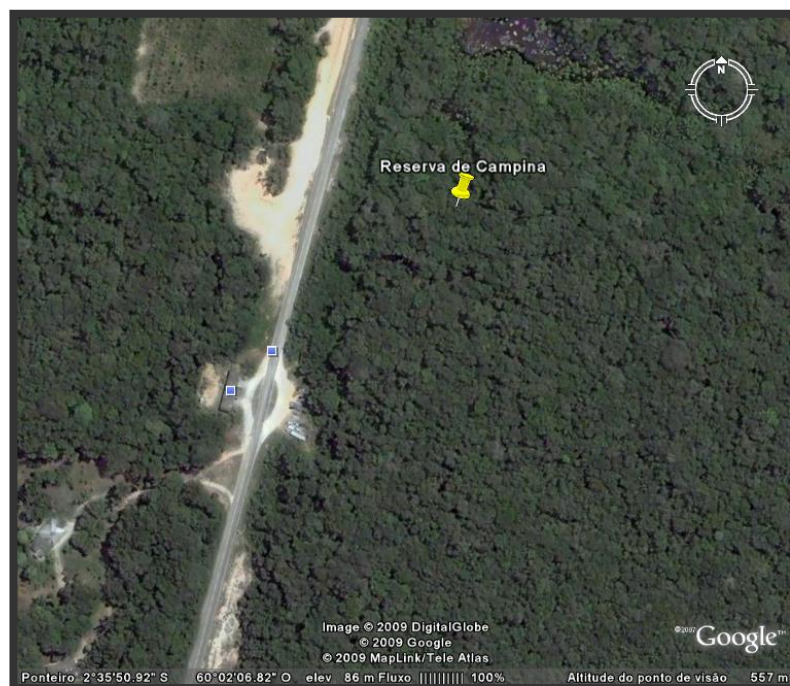


Figura 1. Vista aérea da Reserva Biológica de Campina - BR 174, Manaus- Boa Vista. [google earth](http://google.earth).

O solo bastante arenoso determina uma forte restrição ao crescimento vegetal, apesar da boa pluviosidade anual e da rica fonte de propágulos nas florestas contíguas. Sem condições de reter a umidade e os nutrientes, estes solos são ocupados por uma vegetação típica de locais mais áridos, a campina, com biomassa reduzida esparsa, totalmente distinta da floresta vizinha, que ocupa solos

mais argilosos. A campina representa um estado avançado de sucessão ecológica e demonstra uma boa adaptabilidade àquele ambiente. Entretanto, entre esta e a floresta circunvizinha, vê-se uma grande diferença florística, da biomassa e da regeneração, dentre outros. Entre a campina e a floresta observa-se outra comunidade, sobre o solo arenoso, com maior biomassa, maior diversidade e a presença de espécies da mata mais densa, a campinarana. Neste caso, se destaca uma diferença, em relação à campina, que é uma espessa camada de serrapilheira, sobre a areia e que certamente funciona, em muitos sentidos como o “solo” daquele sistema (Ribeiro e Santos, 1975).

A campinarana e a campina fechada se misturam e ocorre mudança gradual na estrutura da composição da vegetação. As árvores, frequentemente, ultrapassam 10 m, apresentando áreas intermediárias de vegetação mais jovem, formando um dossel extremamente variável em termos de altura e quantidade de sombra que ela fornece. Em termos de composição florística, a campinarana pouco difere da campina sombreada.

A transição da campinarana para a mata densa é brusca e o limite entre os dois tipos de vegetação é geralmente bem definido, principalmente, pelo aparecimento de árvores como as palmeiras e a redução nítida da liteira no solo.

A área de mata densa apresenta composição típica da parte central da região amazônica, onde predomina o latossolo amarelo de textura pesada e muito pesada, com relevo ondulado pela presença de platôs (Freitas e Higuchi, 1993). A cobertura vegetal é composta por árvores que variam de tamanho e que alcançam até 40 metros de altura, onde predominam três famílias botânicas: Lecythidaceae, Leguminosaceae e Sapotaceae.

Em relação ao microclima do ecossistema existem variações anuais definidas de temperaturas do solo, ar e umidade relativa que podem ser de importância para a ecofisiologia da vegetação, microflora e microfauna, bem como são responsáveis pelo aceleração da decomposição do material orgânico de origem vegetal (Ribeiro e Santos, 1975).

3.2- Tipos de coletas/capturas

Neste estudo foram realizadas coletas em três ambientes: campina, campinarana e mata densa (Figura 4), utilizando-se 12 armadilhas luminosas do tipo CDC, distribuídas a 1 m do chão e distanciadas 15 metros uma da outra, sendo quatro por área; três armadilhas de isca animal tipo Disney, uma em cada área em pontos aleatórios. Também foram realizadas algumas capturas de mamíferos com armadilhas para pequenos animais na tentativa de isolar flagelados do gênero *Leishmania*.

3.3- Captura e exame de mamíferos

Foram distribuídas 12 armadilhas do tipo Sherman (mod. LFATDG 23 x 8 x 9 cm) para a captura de pequenos mamíferos e 12 armadilhas modelo Tomahawk (50 x 20 x 20 cm) para captura de animais maiores (Figura 5). Foram distribuídas quatro armadilhas de cada tipo, em cada área, em pontos aleatórios, no período de 12 meses. Com iscas de frutas (banana, abacaxi, mamão) e pasta de amendoim, sendo as armadilhas colocadas no início da semana de coleta, e verificadas diariamente, quando então eram feitas as trocas das iscas. A permissão de captura foi obtida pela licença do Ibama nº 12096-1. Nos animais capturados foram feitas observações macroscópicas para verificar presença de lesões cutâneas, sendo necropsiados para cultivo em meio semi-sólido NNN acrescido de NaCl 0,95% estéril, de fragmentos de tecido epitelial (focinho, patas e orelhas) e vísceras (fígado, baço) dos animais. Também foram estocados fragmentos em álcool absoluto para posterior teste pela PCR.

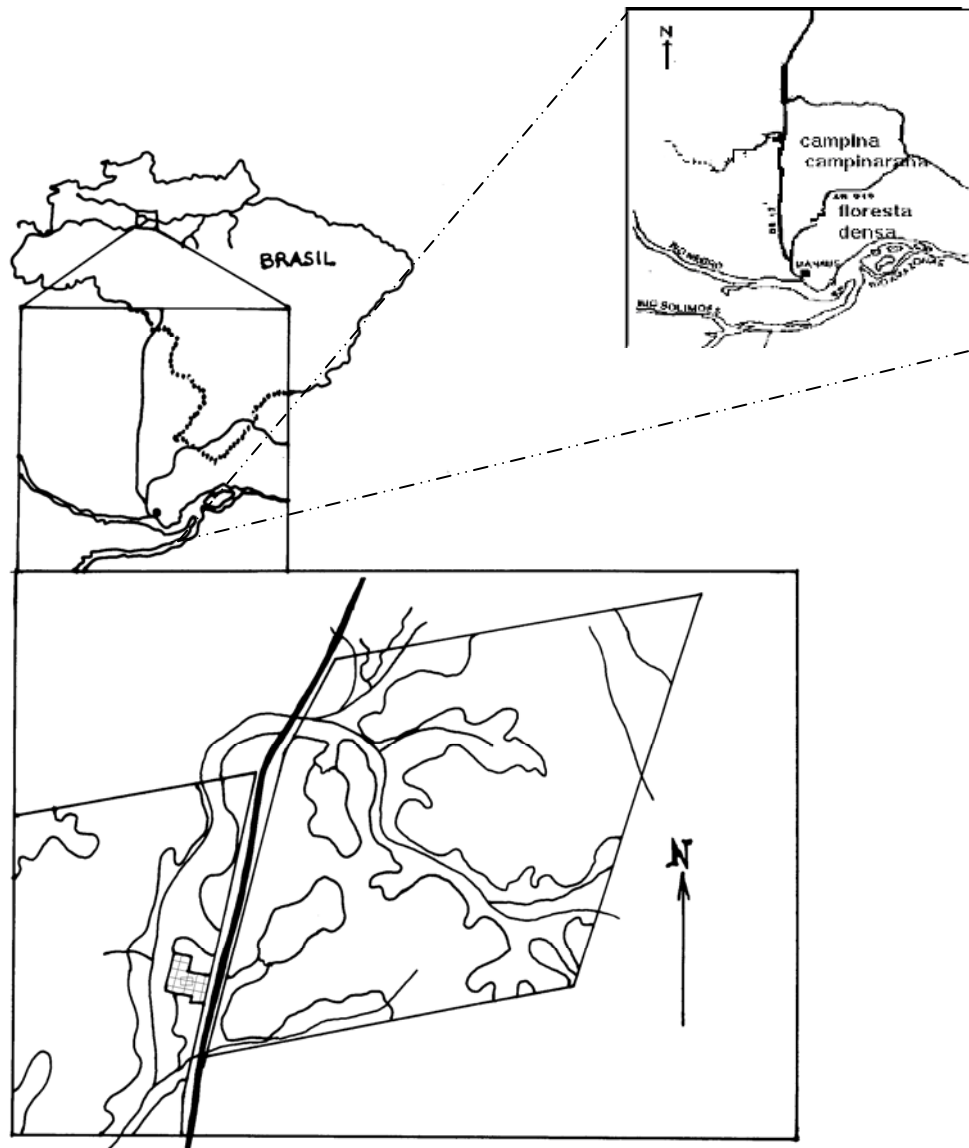


Figura 2. Área da Reserva Biológica de Campina. BR 174, km 42, Manaus-Boa Vista/Brasil. Coelho, Artêmio. 2009.



Figura 3. Perfil da estrutura vegetal da campinarana da Reserva Biológica do INPA (Anderson *et al.*, 1975).

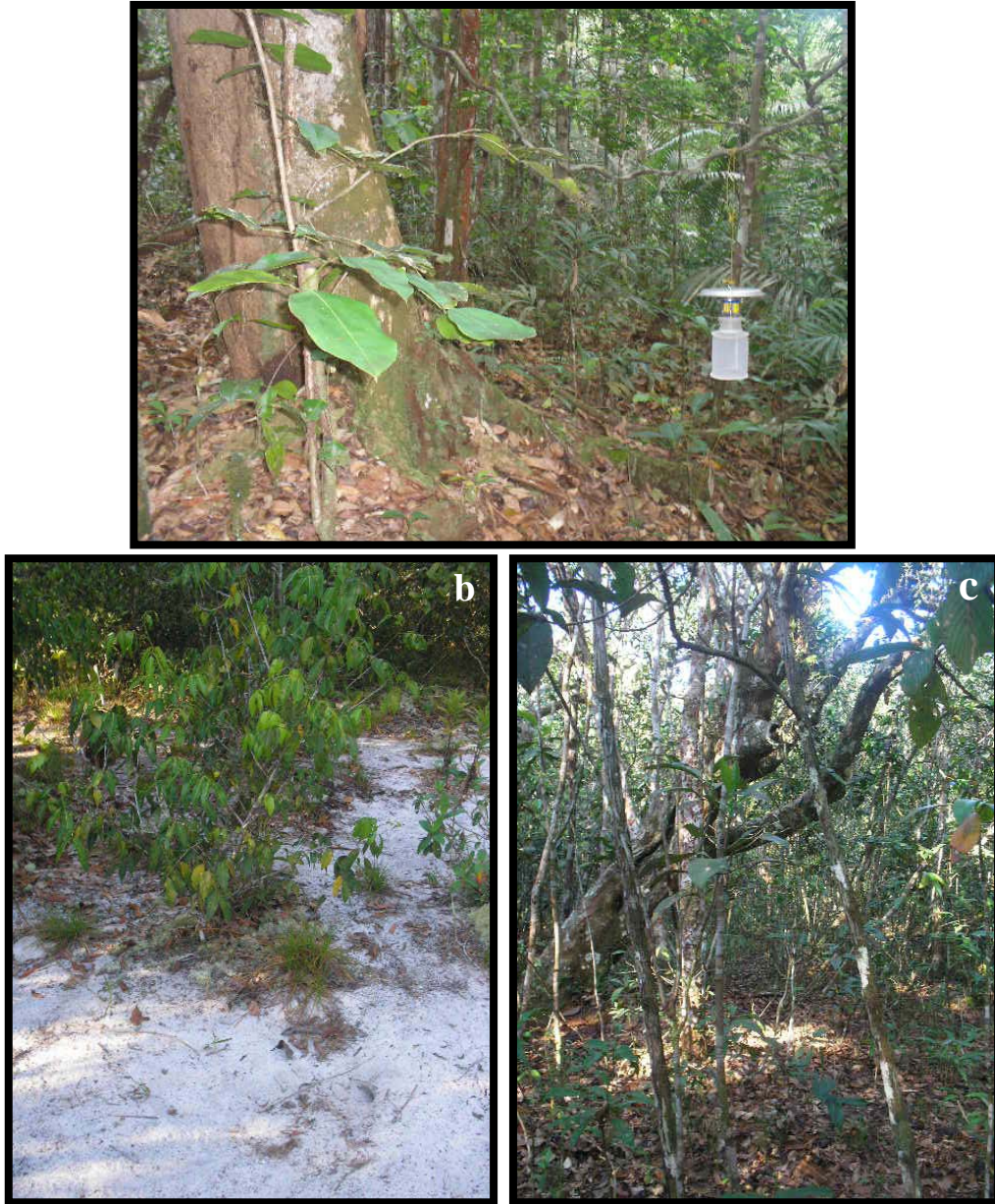


Figura 4. Diferentes ambientes da Reserva Biológica de Campina. INPA. (a) área de mata densa; (b) campina (c) campinarana.



Figura 5. Armadilhas para captura de mamíferos. (a) Modelo Tomahawk (50 x 20 x 20 cm) e (b) Sherman (mod. LFATDG 23 x 8 x 9 cm).

3.4- Coleta de flebotomíneos

Pelo período de 12 meses, a partir de setembro de 2007, foram utilizadas 12 armadilhas luminosas do tipo CDC (CDC “miniature” - Hausherr’ Machine Works, New Jersey, EUA) [Sudia e Chamberlain, 1962], durante quatro noites por semana, em cada mês, colocadas diariamente ao final da tarde e retiradas na manhã seguinte, em cada um dos ambientes (quatro por ambiente). A permissão de coleta foi obtida pela licença do Ibama no. 12096-1 – em anexo). Foram dispostas em árvores a 1 m do chão (Figura 6a), distanciadas aproximadamente 15 metros entre si. Também foram utilizadas armadilhas Disney (Figura 6b) - bandeja de alumínio com furo central, com camada de óleo de rícino, com uma gaiola contendo isca animal/mamífero (Disney, 1966). As armadilhas do tipo “Disney” foram instaladas no solo, com o objetivo de coletar flebotomíneos com hábito zoofílico. Estas foram deixadas durante o período noturno, sendo feita a coleta dos insetos no dia seguinte. Foram utilizadas três armadilhas no total, dispostas em diferentes pontos da mata: a primeira na campina, a segunda na campinarana e uma terceira na mata densa, por um período de quatro noites, uma semana a cada mês. Coletas por aspiração com armadilhas do tipo CDC adaptadas para varredura, foram feitas em tocas de

animais, em troncos caídos, entre outros, com a finalidade de complementar o levantamento de espécies e da taxa de infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Estas coletas foram realizadas durante as horas luminosas do dia.



Figura 6. Métodos de coleta/captura de flebotomíneos. (a) Armadilha luminosa do tipo CDC e (b) armadilha Disney contendo um preá (*Cavia aperea*) no interior de uma gaiola.

3.5- Triagem e identificação de flebotomíneos

Os flebótomos coletados em armadilhas CDC modificada foram triados dos demais insetos e conservados em álcool a 70% para posterior clarificação e identificação; os coletados com armadilhas Disney foram, previamente, lavados em solução detergente para retirada do óleo, sendo os machos conservados em álcool a 70% e as fêmeas dissecadas para detecção de tripanosomatídeos.

Um total de 207 fêmeas capturadas com armadilhas luminosas do tipo CDC e Disney foram dissecadas para detecção e isolamento parasitário. Destes espécimes fez-se a identificação por meio da espermateca montada em bálsamo do Canadá. Quanto à identificação dos machos, estes foram clarificados em solução de

hidróxido de potássio a 10%, ácido acético (10%) e diafanizados em fenol P.A. Posteriormente foram identificados em nível de espécie, utilizando-se a classificação de Young e Duncan (1994), sob microscópio estereoscópio em lâmina escavada, acrescida de fenol. Outro grupo de flebotomíneos (fêmeas) foi estocado em etanol absoluto (Merck) para a reação da PCR.

Neste estudo, as espécies foram identificadas seguindo a chave de Young e Duncan (1994), entretanto, uma lista de espécies em anexo revela a sinonímia da fauna de flebotomíneos da área de Reserva Biológica de Campina de acordo com classificação taxonômica proposta por Galati (2003).

3.6- Detecção de taxa de infecção natural

3.6.1- Dissecção e isolamento de flagelados

O processo de dissecção foi realizado no local de coleta e as informações registradas em fichas de dissecção sobre o conteúdo estomacal (ficha em anexo, contendo as seguintes informações: sangue novo – SN; sangue em decomposição – SD; sem sangue – SS, condições dos ovaríolos [sem visualização de oócitos – tipo I; oócitos nas fases II e III de desenvolvimento – tipo II; oócitos nas fases IV e V de desenvolvimento – tipo III (de acordo com Christophers (1911) e Mer (1936)], densidade de parasitas por campo (+, 1-5; ++ 6-20; +++ 21-40 e ++++ 41-N) e sua localização no trato digestório. Para a identificação das espécies de flebotomíneos foi utilizada a classificação de Young e Duncan (1994). As fêmeas foram dissecadas isolando-se o intestino com auxílio de estiletos, e o material isolado posto entre lâmina e lamínula para observações em microscopia óptica.

3.6.2- Detecção Utilizando a Análise Molecular

a) Extração do DNA:

As fêmeas que não foram utilizadas para dissecação foram acondicionadas em frascos contendo álcool etílico absoluto e estocadas a 4° C para conservação do material. A identificação foi feita com base nos dois últimos segmentos abdominais que contêm as espermatecas, de acordo com classificação de Young e Duncan (1994). Em seguida, 207 espécimes foram escolhidos aleatoriamente e acondicionados em frascos tipo eppendorf para extração do DNA. A extração foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Coen *et al.* (1982). O DNA foi extraído com a rehidratação dos insetos em 10 µL de água destilada estéril (MilliQ) por 10 minutos, para retirar o excesso de álcool, em temperatura ambiente. Cada indivíduo foi macerado em tubos (eppendorf) com bastão plástico e homogeneizado em 50 µL de tampão de lise “Blender Buffer” (5 M NaCl, 0,2 M sucrose, 2 M Tris-HCl e 0,5 M EDTA ph 9,1) acrescido de 50 µL de SDS (Sulfato Dodecyl de Sódio Sigma Company LTDA) a 0,5 M, 1 µL de proteinase K (0,01 mg/µL) e incubado a 65° C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado, 7,5 µL de KAC 8 M (acetato de potássio) a 4° C, homogeneizado e incubado em gelo por 45 minutos. O sobrenadante foi coletado após a centrifugação a 14000 rpm (rotação por minuto), sendo acrescentado 120 µL de ETOH 100%, descartando o “pellet”. Após nova centrifugação (14000 rpm por 10 min.), o ETOH foi descartado, e o DNA foi ressuscitado em 30 µL de TE a 0,1%, sendo mantido a -16°C em freezer até a reação da PCR.

b) Reação em Cadeia da Polimerase – Nested – PCR (Ln-PCR)

O DNA extraído dos insetos foi adicionado na reação da PCR, amplificando-se as regiões de mini-exon de flagelados do gênero *Leishmania*, com o objetivo de se detectar a infecção por representantes dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* nos insetos coletados.

O DNA extraído foi amplificado pela reação de nested – PCR (Ln-PCR). A reação utilizada foi a amplificação da região de mini-exon (“spliced leader RNA

gene”) de *Leishmania* padronizada pelo Dr. José Miguel Rubio Muñoz (Centro de Medicina Tropical, Madrid) e Pinheiro (2004).

A padronização da técnica detecta poucos flagelados por inseto e amplifica a região do mini-exon, reconhecendo pelo menos três representantes dos grupos de leishmânias dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* – discriminando dentro do subgênero *Leishmania* a espécie *L. chagasi* das outras. Esta metodologia possibilita processar um grande número de amostras ao mesmo tempo.

A PCR foi processada pela adição de 10 µL a 30 ng/µL do DNA de cada amostra de DNA ao “mastermix” contendo: 5 µL de tampão 2 mM MgCl₂ 10X; 1,0 µL MgCl₂ 10 mM; 5,0 µL de DMSO a 10% (10 mM); 1,5 µL de deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5 µL 1U/µL de Tth DNA polimerase; 0,5 µL (15 pmol/µL) de cada iniciador para 50 µL de reação. Os reagentes utilizados foram da Invitrogen/Brasil. Os iniciadores foram: S1rev e SL2 (Pinheiro, 2004; Cruz *et al.*, 2002), os quais anelam nas regiões de mini-exon de *Leishmania* para amplificação dos fragmentos. A reação foi realizada em frascos de “ependorf” próprios para evitar a evaporação em 35 ciclos de amplificação realizados em um termociclador automático (Gene Amp. PCR System 9700, Biosystem). As condições das reações foram: desnaturação do DNA a 85° C por 4 min, 94° C por 7 min., 94° C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 50° C por 30 segs. E extensão a 72° C por 20 segs. (com etapa final de 10 min), terminando a 4°C.

Na segunda reação de PCR foram adicionados 2 µL do produto amplificado para um volume final de 50 µL de reação. Os iniciadores foram: SLM1 e SLM2 (Pinheiro, 2004). Os fragmentos obtidos após a amplificação referem-se aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* referente aos tamanhos de 451 pb (pares de base para *L. infantum/ L. chagasi*, 302 pb para *L. (Leishmania) amazonensis* e 242 pb para *L. (Viannia) braziliensis*

As reações seguiram programas idênticos para ambas as amplificações. As etapas das reações foram realizadas em duplicata, em dia e períodos diferentes. Nas etapas de preparo do DNA e misturas da reação da PCR sempre foram utilizados controles negativos com água destilada e “mix” (sem presença de DNA), além de controles positivos obtidos de cultivo parasitário de representantes dos subgêneros: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8).

Alíquotas de 15 µL dos produtos amplificados foram adicionadas a 3 µL de tampão de carga [0,25% (v/v) azul de bromofenol, 0,25% (v/v) de xilenocianol em 40% de solução aquosa de sacarose] e fracionadas por eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão de corrida TAE (40 mM de Tris-Acetato e 1 mM de EDTA pH 8.0) durante 1 hora a 80 Volts. Foi utilizado marcador de peso molecular - 100 pb ladder (Fermentas Life Sciences) para a averiguação do peso molecular dos amplicóns. Os géis foram corados com 2 µL de brometo de etídio (0,75%) e visualizados através de luz ultravioleta em transiluminador a um comprimento de onda de 312 nm e os géis foram documentados usando o sistema fotográfico “Eagle Eye System” Stragene, (La Jolla, USA) no Laboratório de Biologia Molecular do INPA. Após o registro dos géis estes foram analisados, comparando-se com os controles e o tamanho dos amplicóns.

3.7- Análise de dados

A diversidade do local foi calculada utilizando-se o índice de Fisher-Williams (1943), onde alfa é a diversidade na expressão $S = \alpha \ln(1 + N/\alpha)$, S é o número de espécies e N o número total de indivíduos. A taxa de similaridade foi calculada entre os três ambientes pela percentagem da razão entre o número de espécies comuns nas duas áreas (mais e menos alterada) e o total de espécies encontradas.

A taxa de infecção natural (TIN) foi obtida pelo cálculo percentual da razão entre o número de fêmeas infectadas e o número de fêmeas dissecadas por espécie em todos os métodos de coleta que foram utilizados.

Taxa de infecção:

$$TIN = \frac{\text{Nº de flebótomos positivos}}{\text{Nº de flebótomos examinados}} \times 100$$

4. RESULTADOS

Dentro da área de reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42, foram amostrados três ambientes com coletas mensais, sendo um de mata densa, um de campina e outro de campinarana, num total de 900 ha, não sendo delimitada a área dos três ambientes distintos (Figura 4). São apresentados a seguir os resultados obtidos após o levantamento da fauna flebotomínica e detecção de infecção natural por flagelados do gênero *Leishmania* estudados nestes três ambientes na área de Reserva.

4.1- Riqueza de espécies

No período entre setembro de 2007 a agosto de 2008, num total de 12 meses de captura, foram coletados 1.842 espécimes de flebotomíneos, sendo 1.296 fêmeas (70,36%) e 546 machos (29,64%), distribuídos em 22 espécies de oito subgêneros e dois grupos, utilizando-se dois métodos de coleta (armadilha luminosa e Disney) nos três ambientes estudados, sendo todos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Tabela 1).

A espécie encontrada em maior quantidade e distribuída em todas as áreas foi *Lutzomyia flaviscutellata* (1.579/1.842), seguida por *Lutzomyia georgii* (94/1.842) e *Lutzomyia o. nociva* (60/1.842).

Foram coletados 1.143 flebótomos em armadilha luminosa e 699 flebótomos com isca animal. O subgênero com o maior número de espécies foi *Psychodopygus* (5), seguido pelos subgêneros *Nyssomyia* (4), *Evandromyia* (3), *Viannamyia* (2), *Sciopemyia* (2), *Trychopygomyia* (2), *Psathyromyia* (1), *Trichophoromyia* (1), Grupos migonei e aragaoi (Tabela 1).

O índice de diversidade calculado na área da Reserva Biológica de Campina foi de 3,6. Os índices de diversidade dos ambientes estudados representaram valores de 4,2 para mata densa, 1,5 para campinarana e 1,1 para campina, verificando-se maior diversidade de espécies na área de mata densa, ao contrário do observado em áreas de campina e campinarana.

4.2- Abundância relativa

Do total coletado (1.842), a espécie que apresentou maior abundância foi *L. flaviscutellata* 85,72%, seguida de *L. georgii* 5,1%, *L. o. nociva* 3,26% e *L. tuberculata* 1,25% (Tabela 1). Do total, 70,36% eram fêmeas (Figura 7). O número total de fêmeas também foi mais elevado quando as capturas foram realizadas com armadilhas Disney como era de se esperar, pelo hábito hematofágico das mesmas.

Quando esses insetos foram analisados por método de captura, *L. flaviscutellata* foi a mais abundante em todos os ambientes e apresentou o maior número de indivíduos capturados por CDC (79,18%) e Disney (96,42%). No entanto, nas capturas de *L. flaviscutellata* por CDC, quando comparadas por área, campina (455/905) e campinarana (313/905) foram os locais onde maior percentual de espécimes foi capturado (50,28% e 34,58%, respectivamente).

4.3- Distribuição de espécies de acordo com o ambiente

Das capturas realizadas nos três ambientes distintos, verificou-se um total de 623 (33,82%) insetos em área de mata densa, 545 (29,59%) em campinarana e 674 (36,59%) em campina.

Das 22 espécies identificadas (Figura 8), verificou-se que houve variação quanto ao número de espécies e sua distribuição de acordo com o tipo de ambiente onde foram realizadas as capturas e o método de coleta, sendo em armadilha tipo CDC: 21 espécies em área de mata densa, nove em campinarana, seis em campina e com armadilha Disney: quatro em mata densa, uma (01) em campinarana e dois na campina.

Tabela 1. Total de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* capturados durante o período de setembro de 2007 a agosto de 2008 na Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42. Manaus-AM

Subgênero/Grupo	Espécie	Nº total de Espécimes
<i>Nyssomyia</i>		
	<i>Lutzomyia antunesi</i>	03
	<i>L. flaviscutellata</i>	1579
	<i>L. olmeca nociva</i>	60
	<i>L. umbratilis</i>	01
<i>Psychodopygus</i>		
	<i>L. ayrozai</i>	08
	<i>L. claustrai</i>	02
	<i>L. davisii</i>	02
	<i>L. paraensis</i>	07
	<i>L. squamiventris</i>	02
<i>Evandromyia</i>		
	<i>L. georgii</i>	94
	<i>L. inpai</i>	01
	<i>L. monstrosa</i>	07
<i>Viannamyia</i>		
	<i>L. furcata</i>	08
	<i>L. tuberculata</i>	23
<i>Trichopygomyia</i>		
	<i>L. trichopyga</i>	10
	<i>L. raticliffei</i>	10
<i>Trichophoromyia</i>		
	<i>L. ubiquitous</i>	05
<i>Sciopemyia</i>		
	<i>L. nematoducta</i>	01
	<i>L. sordellii</i>	11
<i>Psathyromyia</i>		
	<i>L. shannoni</i>	03
Grupo Migonei		
	<i>L. sericea</i>	01
Grupo Aragaoi		
	<i>L. aragaoi</i>	04
Total		1842

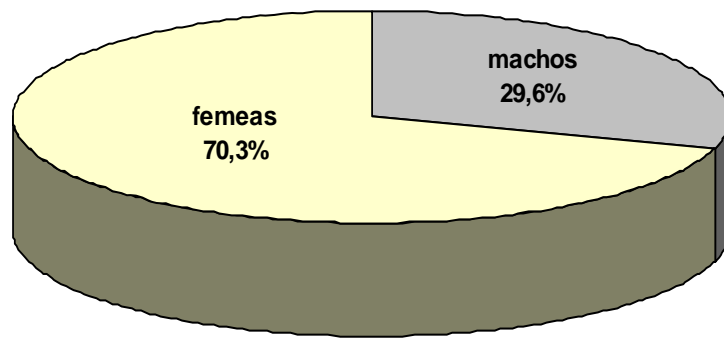


Figura 7. Proporção de machos e fêmeas de flebotomíneos coletados na área de Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42, Manaus, AM.

Mata densa: Quanto ao número total de indivíduos capturados em área de mata densa (623), 551 foram fêmeas (88,44%) e 72 (11,56%) machos. Do total, 394 eram *L. flaviscutellata*, sendo 340 (86,3%) fêmeas e 54 (13,7%) machos, tendo uma maior contribuição quanto ao número de fêmeas quando utilizada a armadilha Disney (254 fêmeas e três machos). Um total de 21 espécies foram identificadas neste ambiente, demonstrando-se uma maior diversidade quando coletados com armadilha CDC.

Campinarana: Do número total de indivíduos capturados em área de campinarana (545), 395 foram fêmeas (72,5%) e 150 (27,5%) machos. Deste total, 524 eram da espécie *L. flaviscutellata*, sendo 376 (71,7%) fêmeas e 148 (28,2%) machos, tendo uma maior contribuição quanto ao número de fêmeas quando utilizada a armadilha Disney (200 fêmeas e 11 machos). Um total de nove espécies foram identificadas neste ambiente, sendo apenas uma (*L. flaviscutellata*) coletada em armadilha Disney, apesar da maioria das espécies ser zoofílica.

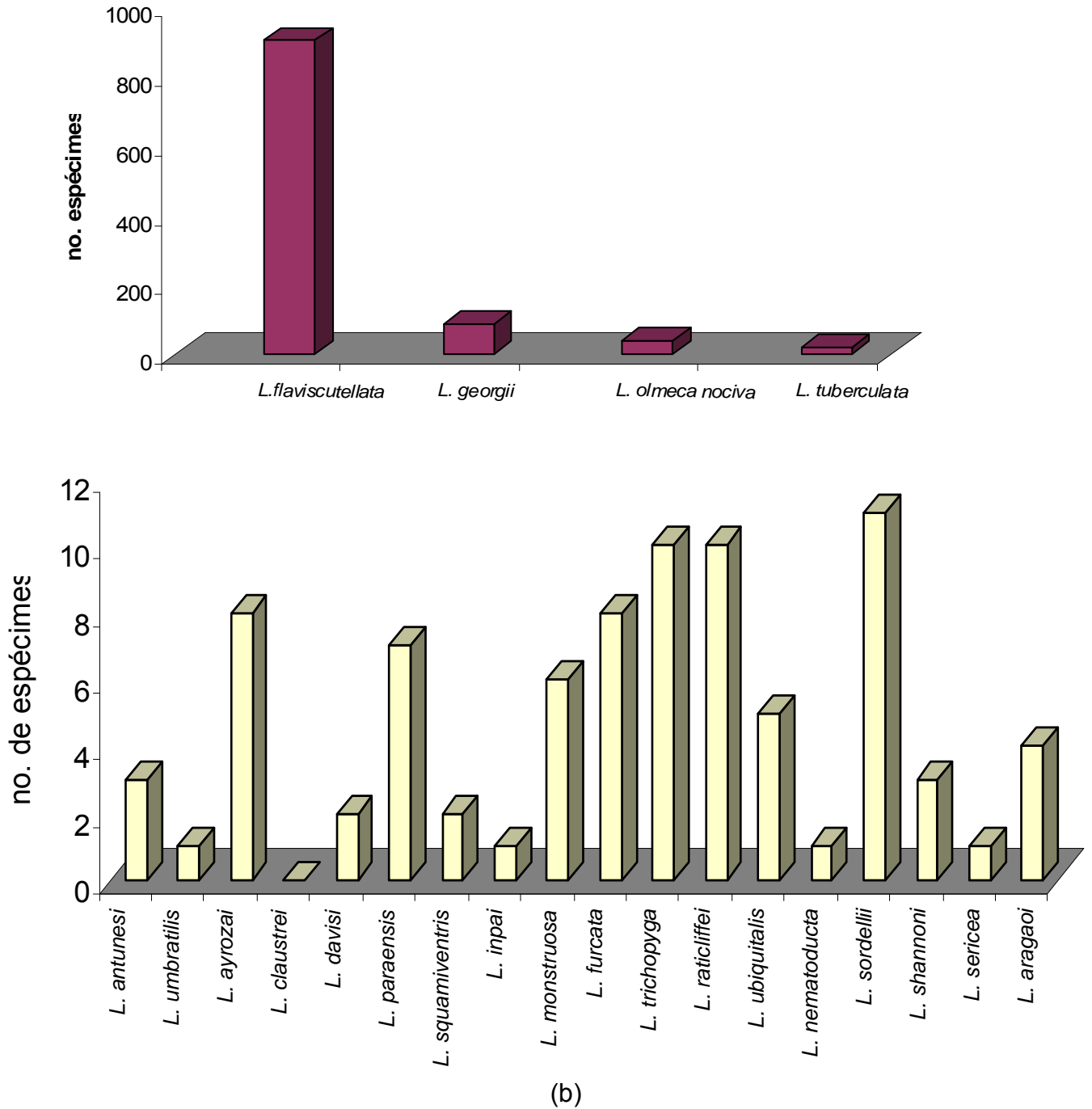


Figura 8. Abundância de espécies do gênero *Lutzomyia* capturadas com armadilha luminosa, em três ambientes na área de Reserva Biológica de Campina, AM, Brasil. (a) Espécies mais abundantes; (b) Todas as outras espécies.

Campina: Independente do método de captura, quanto ao número total de indivíduos capturados em área de campina (674), 351 foram fêmeas (52,1%) e 323 (47,9%) machos. Do total, 661 (98,1%) eram *L. flaviscutellata*, sendo capturadas 339 (51,3%) fêmeas e 322 (48,7%) machos, tendo uma maior contribuição quanto ao número de fêmeas quando utilizada a armadilha Disney (200 fêmeas e seis machos). Um total de seis espécies foram identificadas neste ambiente, demonstrando-se ser esta área a que apresentou a menor diversidade e maior abundância quando as capturas foram realizadas com armadilhas CDC (Figura 9). Foi também na área de campina que se verificou o maior número de espécimes de *L. flaviscutellata* capturados em CDC (Figura 10), principalmente machos (Figura 11).

4.4- Distribuição das espécies de acordo com o tipo de captura

CDC: Foram capturadas 1.143 espécimes de flebotomíneos nos três ambientes com armadilhas do tipo CDC, sendo 618 fêmeas (54,1%) e 525 machos (45,9%), distribuídos em 21 espécies de oito subgêneros e dois grupos (Tab. 1). Das espécies estudadas apenas *L. clauserei* não foi capturada em armadilha luminosa do tipo CDC, em nenhum dos ambientes no qual foi feito o levantamento.

Os machos apresentaram maior abundância em coletas com armadilhas CDC (93%, 525/1.143) do que com a Disney (2,86%, 20/699), sendo encontrados em maior quantidade nas áreas de campina (27,73%, 317/1.143), seguido de campinarana (12,16%, 139/1143) e mata densa (6,04%, 69/1143) [Tab. 1]. Entretanto, verificou-se um maior número de espécimes fêmeas (54,07%, 618/1.143) com CDC, principalmente na campinarana (28,47%, 176/618). A diversidade de espécies foi maior também utilizando-se a CDC, principalmente em área de mata densa (Tab 2 e 3).

As coletas realizadas por aspiração não foram satisfatórias, em virtude da baixa densidade de possíveis abrigos dos insetos.

Disney: Em todos os ambientes as fêmeas foram mais abundantes (97,13%, 679) em coletas com armadilhas Disney (Figura 12), tendo maior diversidade em áreas de mata densa (quatro espécies, 254 espécimes), seguida pela área de campina (duas

espécies, 200 espécimes) e campinarana (uma espécie, 200 espécimes). Dentre os machos coletados, todos os 20 eram da espécie *L. flaviscutellata*, que também foi encontrada em maior quantidade e distribuída em todas as três áreas, seguida por *L. o. nociva* (18), *L. georgii* (4), *L. clauserei* (2) e *L. monstruosa* (1). Neste estudo, a espécie *L. clauserei* (Tab. 2 e 3) foi coletada apenas utilizando-se a armadilha Disney, sendo dois exemplares fêmeas na área de campina. Esta espécie tem envolvimento na transmissão de *L. (V.) naiffi* e pode ser encontrada em ambientes de floresta e áreas marginais de mata (Aguiar e Medeiros, 2003), sem registros levantados quanto a sua ocorrência em área de campina.

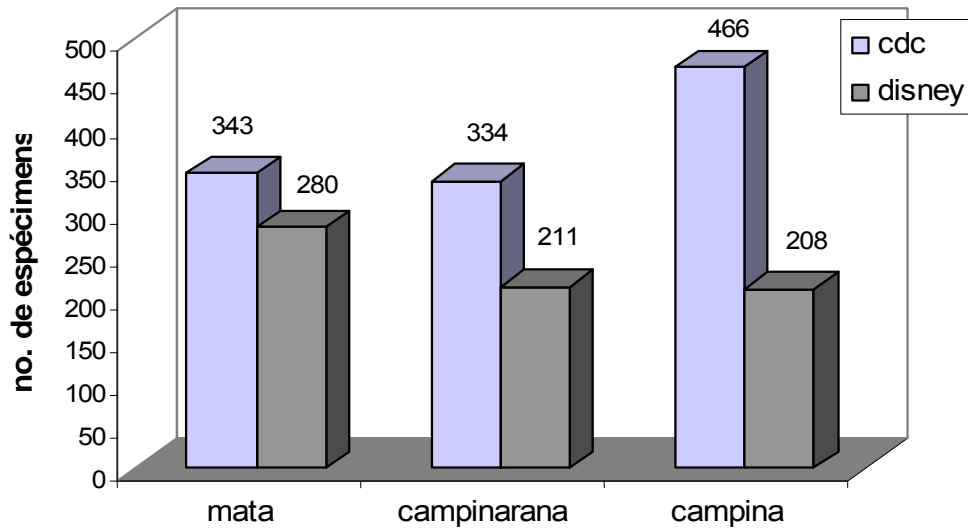


Figura 9. Número total de flebotomíneos capturados por ambiente e tipo de armadilha, na Reserva Biológica de Campina, INPA, Manaus, AM.

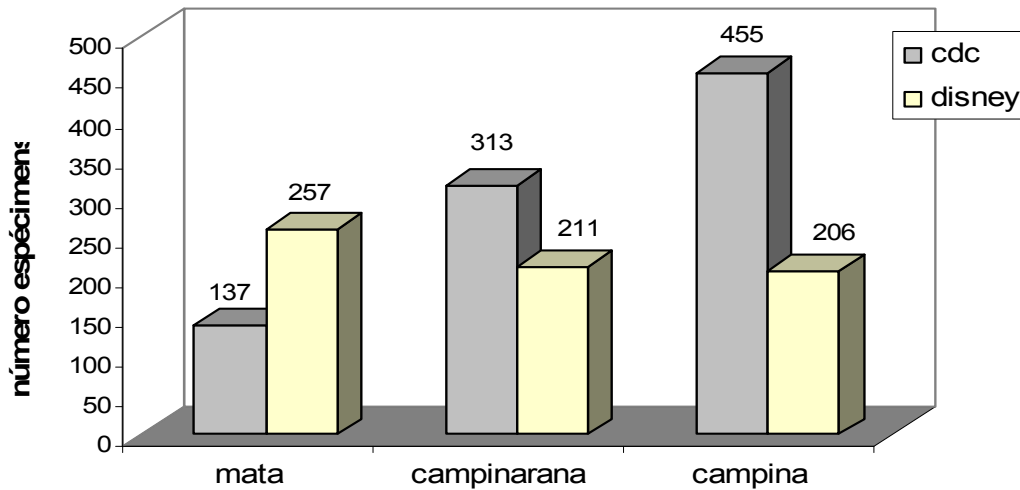
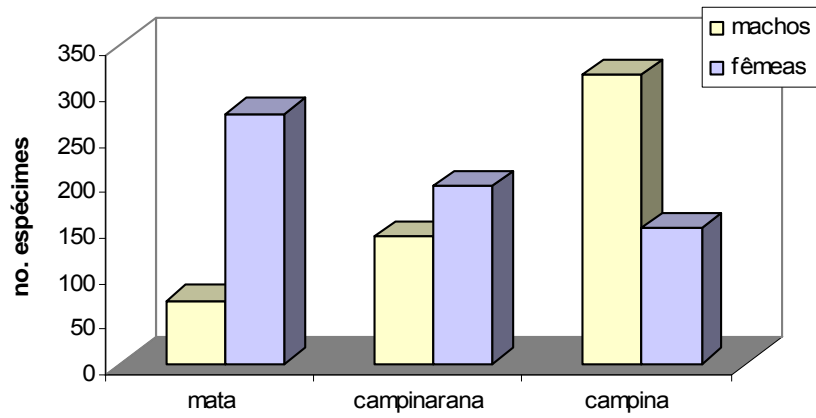
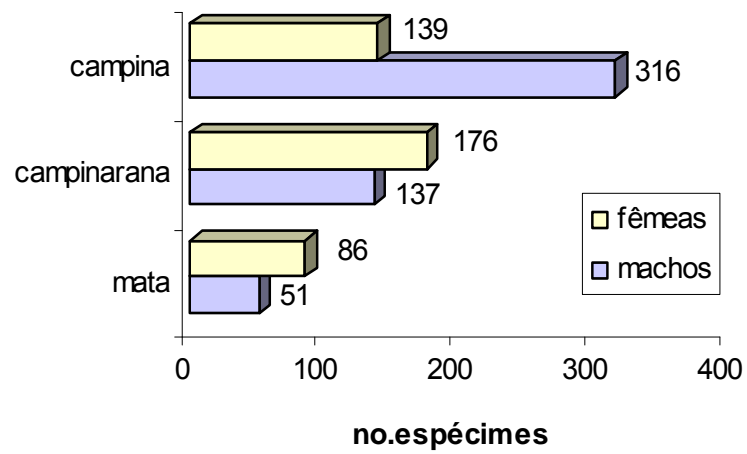


Figura 10. Total de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia flaviscutellata* capturados por tipo de armadilhas e ambientes distintos.

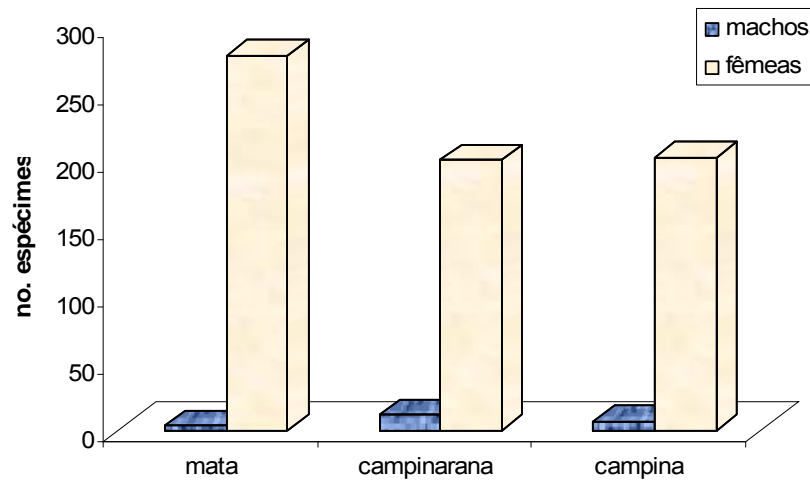


(a)

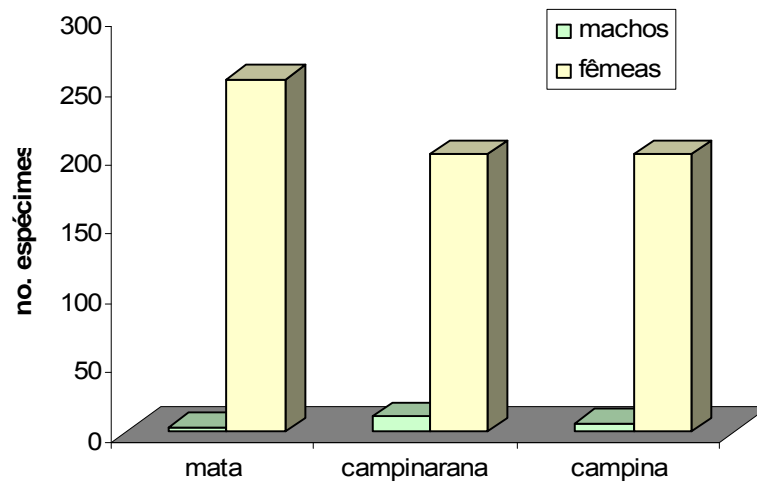


(b)

Figura 11. Total de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em três ambientes com armadilha luminosa do tipo CDC: (a) todos os espécimes de flebotomíneos capturados e (b) apenas da espécie *Lutzomyia flaviscutellata*.



(a)



(b)

Figura 12. Total de machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em três ambientes por armadilha Disney. (a) todos os espécimes de flebotomíneos capturados e (b) apenas *Lutzomyia flaviscutellata*.

4.5- Exame de animais capturados

Com as armadilhas Sherman foram realizadas capturas ao longo do ano, no entanto, somente dois animais da espécie *Marmosa* sp. (Figura 13), foram capturados na área de campina em agosto de 2008, não sendo possível avaliar a infecção natural para tripanosomatídeos devido às dificuldades na conservação do material em campo, e no transporte até o laboratório. Foram negativas as capturas com armadilhas Tomahawk.

Além desses animais foram feitas observações da circulação de répteis (cobras, lagartos) e mamíferos roedores (cutia), que poderiam servir como fonte de alimento para os flebotomíneos.



Figura 13. *Marmosa* sp. (Marsupialia: Didelphidae) capturada com armadilha Sherman na Reserva Biológica de Campina, INPA, AM-BR.

Tabela 2. Distribuição das espécies de flebotomíneos capturadas com armadilhas tipo Disney e armadilha de luz tipo CDC, em diferentes ambientes na Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42

Subgênero	Espécies	CDC			Disney		
		MD	CN	CA	MD	CN	CA
<i>Nyssomyia</i>	<i>L. antunesi</i>	x	x				
	<i>L. flaviscutellata</i>	x	x	x	x	x	x
	<i>L. olmeca nociva</i>	x		x	x		
	<i>L. umbratilis</i>	x					
<i>Psychodopygus</i>	<i>L. ayrozai</i>	x	x	x			
	<i>L. claustrai</i>						x
	<i>L. davisii</i>	x					
	<i>L. paraensis</i>	x	x	x			
	<i>L. squamiventris</i>	x	x				
<i>Evandromyia</i>	<i>L. georgii</i>	x	x	x	x		
	<i>L. inpai</i>	x					
	<i>L. monstrosa</i>	x			x		
<i>Viannamyia</i>	<i>L. furcata</i>	x	x	x			
	<i>L. tuberculata</i>	x					
<i>Trichopygomyia</i>	<i>L. trichopyga</i>	x					
	<i>L. raticliffei</i>	x	x				
<i>Trichophoromyia</i>	<i>L. ubiquitalis</i>	x					
<i>Sciopemyia</i>	<i>L. nematoducta</i>	x					
	<i>L. sordellii</i>	x		x			
<i>Psathyromyia</i>	<i>L. shannoni</i>	x					
Grupo Migonei	<i>L. sericea</i>	x					
Grupo Aragaoui	<i>L. aragaoui</i>	x	x				

L. = *Lutzomyia*; *: Isca animal: *Cavia aperea*; MD: mata densa; CN: campinarana; CA: campina

Tabela 3. Levantamento de espécies de flebótomos utilizando-se armadilhas do tipo CDC e tipo Disney, em três ambientes (mata densa, campinarana e campina) na Reserva Biológica de Campina, BR 174, km 42. Manaus-AM

Espécies	Métodos de Coleta / ambientes													Total	
	CDC						Subtotal	Disney*							subtotal
	MD		CN		CA			MD		CN		CA			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂/♀		
<i>L. antunesi</i>	-	1	1	1			3								3
<i>L. aragaoi</i>	-	2	-	2			4								4
<i>L. ayrozai</i>	1	2	-	4		1	8								8
<i>L. clautrei</i>	-	-	-									2	2	2	2
<i>L. davisii</i>	-	2	-				2								2
<i>L. flaviscutellata</i>	51	86	137	176	316	139	905	3	25	11	200	6	200	674	1579
<i>L. furcata</i>	-	7	-	1		0	8								8
<i>L. georgii</i>	-	77	-	8		5	90	4						4	94
<i>L. inpai</i>	1						1								1
<i>L. monstruosa</i>	2	4					6	1						1	7
<i>L. nematoducta</i>	-	1					1								1
<i>L. olmeca nociva</i>	2	39			1		42	18						18	60
<i>L. paraensis</i>	1	2		1		3	7								7
<i>L. raticliffei</i>	3	5	1	1			10								10
<i>L. sericea</i>	-	1					1								1
<i>L. shannoni</i>	1	2					3								3
<i>L. sordellii</i>	3	7				1	11								11
<i>L. squamiventris</i>	1			1			2								2
<i>L. trichopyga</i>	2	8					10								10
<i>L. tuberculata</i>	-	23					23								23
<i>L. ubiquitalis</i>	1	4					5								5
<i>L. umbratilis</i>	-	1					1								1
Total	69	274	139	195	317	149	1143	3	277	11	200	6	202	699	1842

L. = *Lutzomyia*; *: Isca animal: *Cavia aperea*; MD: mata densa; CN: campinarana; CA: campina.

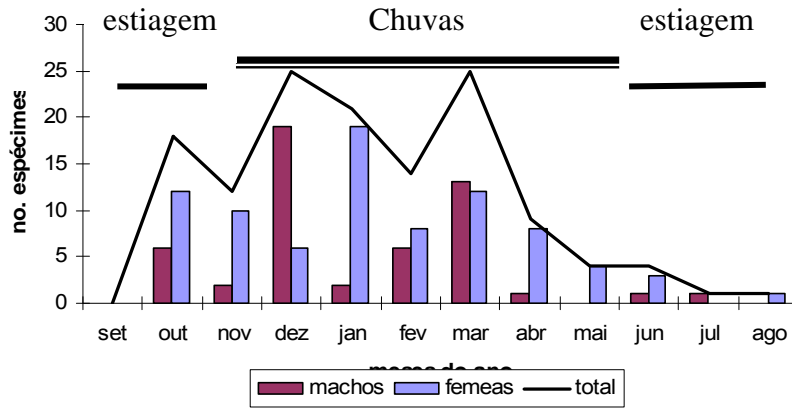
4.6- Distribuição sazonal

Devido à maior densidade populacional ter sido com a espécie *L. flaviscutellata*, a avaliação sazonal foi analisada apenas para esta espécie. Observou-se que o período de chuvas foi o que apresentou a maior abundância de espécimes para ambos os métodos de captura (Figura 14 e 15). No mês de dezembro observou-se maior número de machos em todos os ambientes no qual se utilizou armadilhas do tipo CDC (Figura 14), podendo chegar até o dobro do número de fêmeas capturadas, como nas áreas de mata densa e campina. Geralmente nestas áreas (mata densa e campina) ao longo do período de estiagem verificou-se uma menor proporção de espécimes, em sua maioria fêmeas. É nítida a maior quantidade de machos de *L. flaviscutellata* durante todo o período de chuvas na área de campina, fato que não corresponde ao observado na campinarana (Figura 14b e 14c).

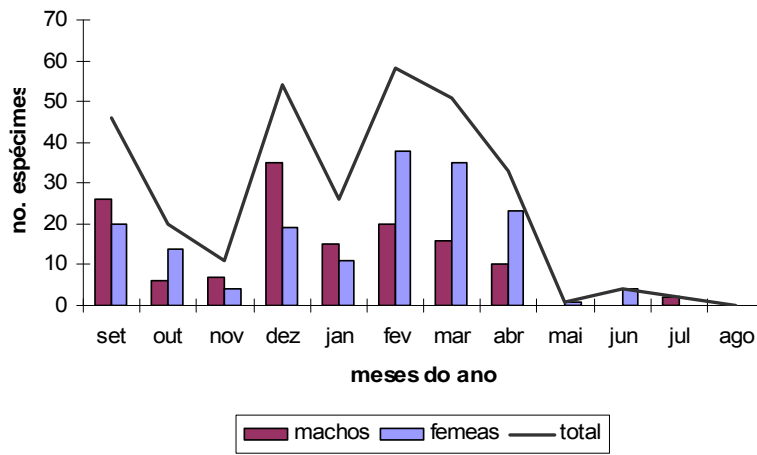
4.7- Taxa de infecção natural por tripanosomatídeos

a) Por dissecação do tubo digestório

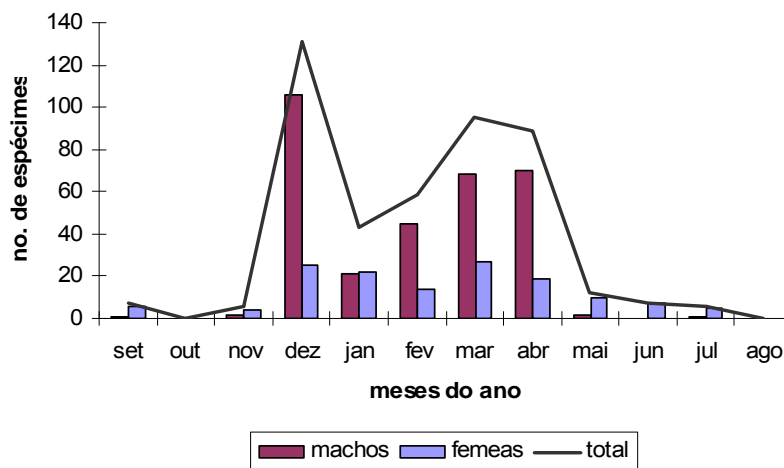
Das fêmeas de flebotomíneos capturadas utilizando-se armadilha luminosa (47,65%, 618/1297) e Disney (52,35%, 679/1297), 207 foram dissecadas para verificar a presença de flagelados no trato digestório, 50 espécimes capturadas com armadilha luminosa e 157 espécimes capturadas com armadilha Disney. Deste total nove espécies foram capturadas nos seguintes locais: a) na mata densa - oito espécies (65 espécimes) que são: *L. flaviscutellata* (70,8%), *L. georgii* (7,7%), *L. o. nociva* (10,8%), *L. aragaoi* (1,5%), *L. ayrozai* (1,5%), *L. trichopyga* (4,7%), *L. tuberculata* (1,5%), *L. paraensis*, (1,5%); b) na campinarana – três (59 espécimes) de: *L. flaviscutellata* (96,6%), *L. georgii* (1,7%), *L. ayrozai* (1,7%) e c) na campina - duas (83 espécimes) espécies: *L. flaviscutellata* (98,8%) e *L. sordellii* (1,2%).



(a) área de mata densa



(b) área de campinarana



(c) área de campina

Figura 14. Distribuição mensal de *Lutzomyia flaviscutellata* por ambiente, capturadas com armadilha luminosa (CDC) na Reserva Biológica de Campina, Manaus, AM (a) mata densa; (b) campinarana e (c) campina.

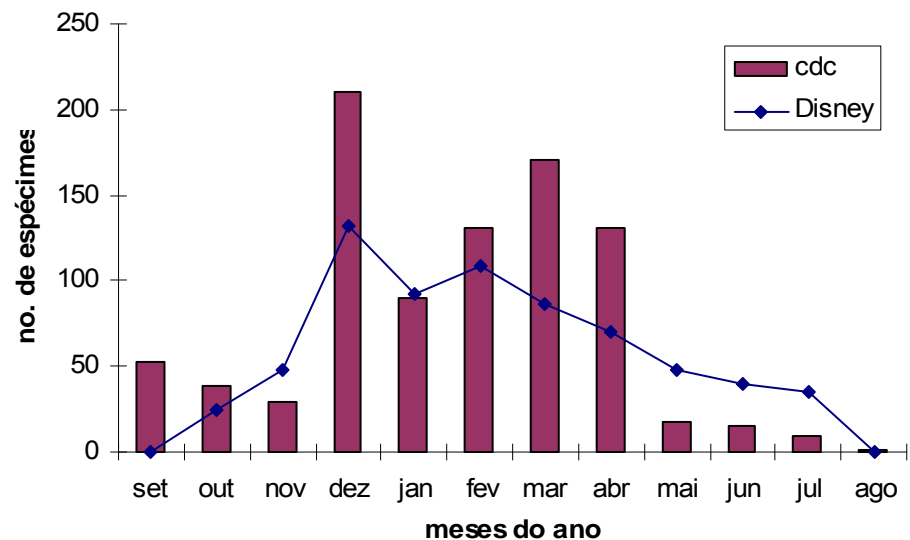


Figura 15. Distribuição mensal de *Lutzomyia flaviscutellata*, capturada com armadilha luminosa (CDC) e Disney na Reserva Biológica de Campina, Manaus, AM.

Deste total, 195 (94,2%) não estavam ingurgitadas de sangue, 10 (4,8%) com sangue em decomposição e duas (1%) apresentavam sangue fresco. A maioria (88,9%, 184) apresentava ovariolos sem condições de visualização, sendo 18 (8,7%) com oócitos na fase IV e V de desenvolvimento e 5 (2,4%) apresentavam oócitos na fase II e III de desenvolvimento (Tab. 4).

Não foi possível detectar infecção natural em nenhuma das 207 fêmeas que foram dissecadas.

Tabela 4. Espécies de fêmeas de flebotomíneos identificadas e dissecadas para pesquisa de infecção natural por tripanosomatídeos.

Espécie	Mata densa			Campinarana			Campina												
	IM			Ovários			IM			Ovários									
	SF	SD	SS	1	2	3	SF	SD	SS	1	2	3	SF	SD	SS	1	2	3	
<i>L. aragaoi</i>			1			1													
<i>L. ayrozai</i>			1			1			1		1								
<i>L. flaviscutellata</i>	1	2	44	78	1		1	6	50	17	3	12		2	78	71			2
<i>L. georgii</i>			5	6					2		1								
<i>L. olmeca nociva</i>			7	7															
<i>L. paraensis</i>			1	1															
<i>L. sordellii</i>															1	1			
<i>L. trichopyga</i>			3	2		1													
<i>L. tuberculata</i>			1			1													
Total	1	2	63	94	1	4	1	6	53	18	4	12	2	79	72			2	

SF= sangue fresco

SD = sangue em decomposição

SS = sem sangue

IM= intestino médio; *L.*= *Lutzomyia*

1 = ovário em desenvolvimento

2 = oócitos em estágio I e II

3 = oócitos em estágio III, IV e V

b) Detecção de infecção natural por *Leishmania* através da Ln-PCR

Das 1.297 fêmeas capturadas em todos os ambientes, 188 foram submetidas à reação da PCR (Tab. 5), destas 153 (11,8 %) eram *L. flaviscutellata*; 13 (1,0%) *L. georgii* e 10 (0,8%) *L. o. nociva*. Sendo *L. flaviscutellata* e *L. o. nociva* incriminadas como vetores de *Leishmania amazonensis*. Um total de 22 fêmeas de flebotomíneos capturadas na Reserva Biológica de Campina, apresentaram positividade para presença de DNA de *Leishmania* sp. com produtos amplificados (Figura 16 e 17), compatível para o gênero *Leishmania*. Das 22 espécimes positivas pela Ln-PCR, utilizando-se armadilhas luminosas (CDC) verificou-se que: 55,6% (10/18) eram *L. flaviscutellata* de área de mata densa, 7,7% (2/26) de campinarana e

5,9% (2/34) de campina; 15,4% (2/13) eram *L. georgii* e 22,2% (2/9) de *L. o. nociva*, ambas de área de mata densa (Tabela 5).

Nas coletas com armadilha Disney: 8,1% (3/37) eram *L. flaviscutellata* de área de campinarana e 9,1% (1/11) de campina. Não foi observada a presença de sangue no trato digestório em nenhuma das fêmeas utilizadas na extração de DNA.

A taxa de infecção parasitária por *Leishmania* sp. foi de 11,76 para a *L. flaviscutellata*, 15,38 para *L. georgii* e 20,0 em *L. o. nociva*.

Tabela 5. Total de fêmeas de flebotomíneos submetidas à Reação de PCR para detecção de infecção por tripanosomatídeos, capturadas em diferentes ambientes (mata densa, campinarana e campina) na Reserva Biológica de Campina. BR 174, km 42. Manaus-AM

Espécie	CDC			Disney			Total	Total de infectados
	MD	CN	CA	MD	CN	CA		
<i>L. aragaoi</i>	2						2	
<i>L. ayrozai</i>	1	1					2	
<i>L. flaviscutellata</i>	18	26	34	27	37	11	153	18
<i>L. georgii</i>	13						13	2
<i>L. o. nociva</i>	9			1			10	2
<i>L. paraensis</i>			2				2	
<i>L. sericea</i>	1						1	
<i>L. sordellii</i>	1						1	
<i>L. umbratilis</i>	1						1	
<i>L. tuberculata</i>	1						1	
<i>L. trichopyga</i>	1						1	
<i>L. ubiquitalis</i>	1						1	
Total	49	27	36	28	37	11	188	22

MD: mata densa; CN: campinarana; CA: campina; CDC: armadilha luminosa; *L.*: *Lutzomyia*

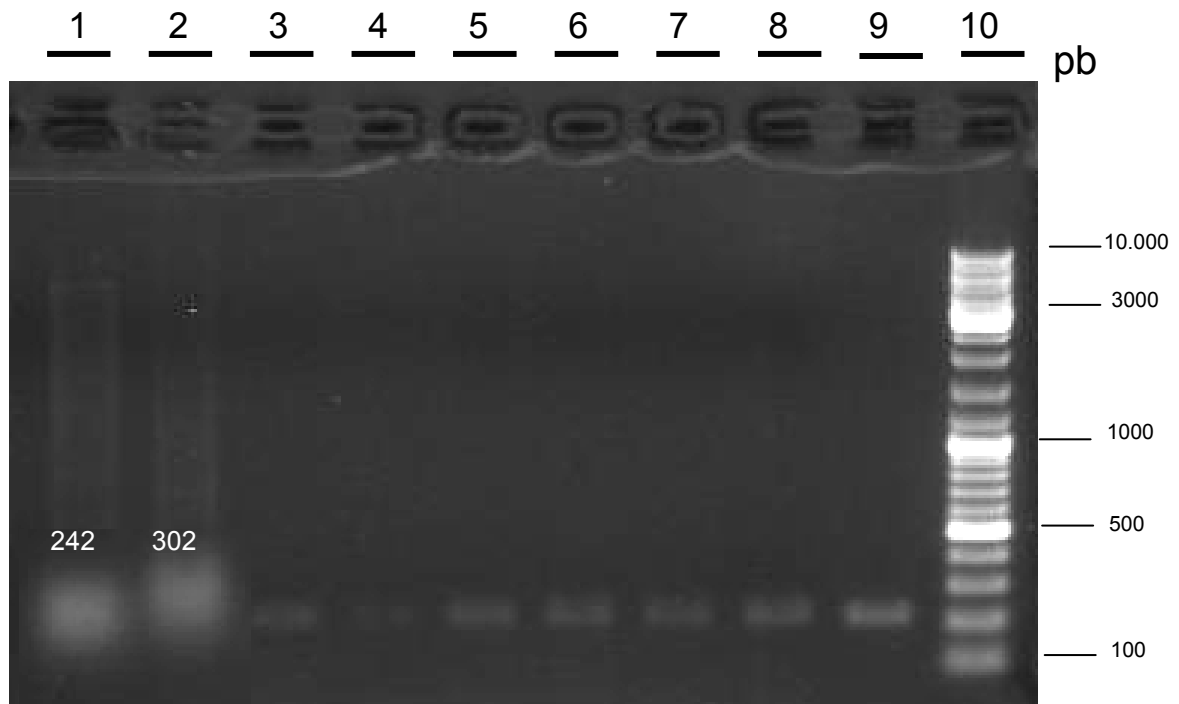


Figura 16. Detecção de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, Gel de agarose a 2% com os produtos de amplificação da região de mini-exon pela Ln – PCR. Amostras amplificadas/nº posição no gel): *L. (Viannia) guyanensis* – 242 pb (1); *L. (Leishmania) amazonensis* 302 pb (2); *Lutzomyia flaviscutellata* (3, 4, 5, 6 e 9); *Lutzomyia georgii* (7); *L. olmeca nociva* (8). Marcador de peso molecular (10).

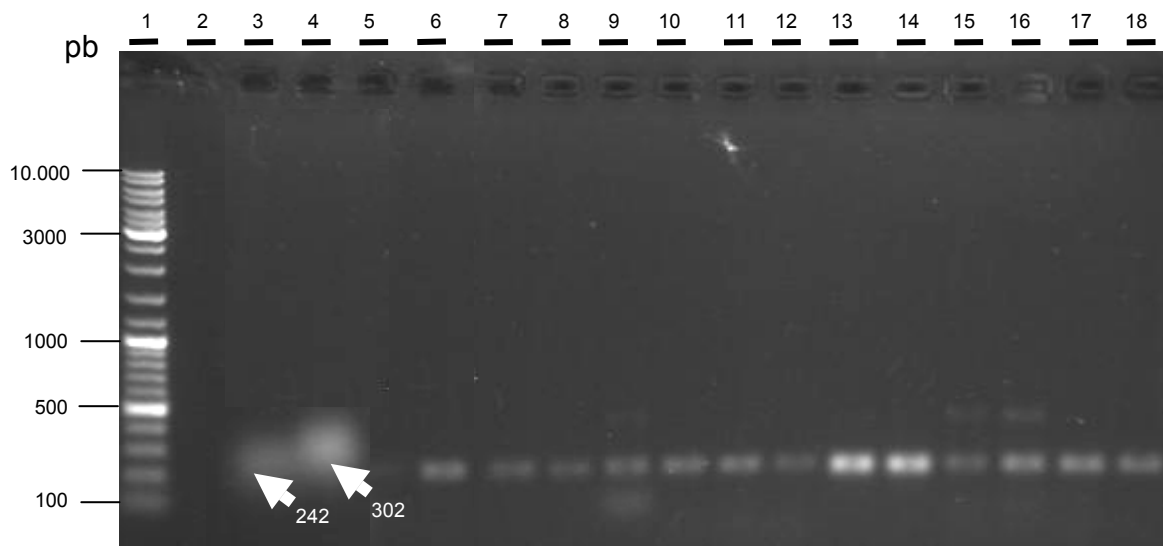


Figura 17. Detecção de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, Gel de agarose a 2% com os produtos de amplificação da região de mini-exon pela Ln – PCR. Amostras amplificadas/nº posição no gel): *Leishmania (Viannia) guyanensis* (3); *L. (Leishmania) amazonensis* (4); *Lutzomyia flaviscutellata* (5 – 13, 15-17); *L. olmeca nociva* (14), *L. georgii* (18); controle negativo H₂O (2), peso molecular (1). Modificada para melhor visualização.

4.8- Animal sentinela

Foram utilizados três hamsters (*Mesocricetus auratus*) que serviram como animais sentinela. Cada um disposto em uma área de estudo: mata densa, campinarana e campina, mantidos no interior de gaiolas, onde recebiam alimento e água *ad libitum*. Estes ficaram expostos durante quatro dias consecutivos, uma semana a cada mês, ao longo dos dozes meses de estudo. Após três meses da última exposição, foram sacrificados, sendo retirados fragmentos de pele do focinho, fígado e baço que foram macerados em solução salina e semeados em meio bifásico NNN acrescido NaCl 0,95% estéril. Este material semeado foi examinado após 15 dias. Parte dos fragmentos dos tecidos, foi mantida em etanol absoluto, acondicionados a -16° C, para posterior reação de Ln- PCR e detecção da presença de flagelados. Não foi evidenciada presença de *Leishmania* em nenhum dos métodos utilizados (cultivo e Ln- PCR).

5. DISCUSSÃO

Nas florestas de terra firme da região amazônica observam-se riqueza e abundância de espécies de flebotomíneos (Cabanillas e Castellón, 1999), entretanto essa abundância e riqueza podem mudar quando são alteradas as características da flora local. A composição de espécies de uma população de flebotomíneos pode ser influenciada pela resultante das condições geográficas, meteorológicas e microclimáticas, do tipo de solo e vegetação presente em determinada área. Deste modo, similaridade dentro da composição específica, pode ser esperada em lugares que possuam condições similares, utilizando métodos de coletas iguais (Feliciangeli, 1987). Em uma floresta de terra firme na Amazônia central ocorreu uma diminuição na abundância de flebotomíneos logo após o corte de árvores (Pessoa *et al.*, 2000). O mesmo foi constatado em florestas secas tropicais da Colômbia (Travi *et al.*, 2002).

A floresta tropical oferece a maior variedade de abrigos e, por isso, é o local onde ocorre o maior número de espécies de flebotomíneos. Abrigos que se tornam excessivamente úmidos são abandonados, contudo, podem ser novamente ocupados quando as condições voltam a ser favoráveis (Aguiar e Medeiros, 2003). Já nas áreas de campina e campinarana os solos são empobrecidos e a vegetação é restrita, limitado os abrigos e fontes de alimentos para os insetos. Desta forma, interferem na riqueza e diversidade de espécies de flebotomíneos, principalmente quando são comparados às áreas de mata densa, fatos observados neste estudo.

Na Reserva de Campina foram encontradas 22 espécies. Em estudos realizados em mata densa, utilizando o mesmo tipo de armadilha de luz (CDC), em períodos equivalentes foi encontrada uma maior riqueza, 45 e 37 espécies (Castellón *et al.*, 1989; 1994) na BR 174, nas proximidades da Reserva de Campina e na BR 319; 22 espécies no município de São Gabriel da Cachoeira (Fé *et al.*, 1998); 39 espécies, na BR 174 em uma estação próxima à Reserva de Campina (Dias-Lima *et al.*, 2003); 43 espécies no município de Manacapuru (Silva *et al.*, 2007) e 25 espécies na construção do gasoduto Coari-Manaus/AM (Gomes *et al.*, 2009). As espécies mais abundantes na Reserva de Campina foram *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. olmeca nociva* (que estão entre as espécies vetoras de *L. (V.) amazonensis*) e *L. georgii*. Em estudos realizados em área de mata densa de

floresta primária a espécie mais abundante foi *L. umbratilis*, que é o vetor primário de *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Na Reserva de Campina, esta espécie foi representada por um único indivíduo. A maior frequência de *Lutzomyia flaviscutellata* e *L. olmeca nociva* se deve ao fato de parte das coletas terem sido realizadas com armadilhas de isca animal (Disney), que é o método mais indicado para coleta dessas espécies. Provavelmente a dominância de *L. umbratilis* em áreas de floresta primária seja explicada pelo hábito dessa espécie de pousar em troncos de árvores de grande porte durante o dia, que não são encontradas em áreas de campina e campinarana. As demais espécies registradas foram encontradas em menor frequência, sendo que a maioria (21) registrada na área de mata densa, que apresenta composição típica semelhante às demais áreas da região amazônica (Freitas e Higuchi, 1993). Destas espécies, *L. antunesi*, *L. ayrozai*, *L. paraensis* e *L. squamiventris* são descritas como vetores de leishmaniose ao homem. No entanto, devido à densidade populacional destas nesta área, o mais provável é que a transmissão vetorial possa estar muito mais relacionada com *Lutzomyia flaviscutellata* e *L. olmeca nociva*.

A espécie *L. flaviscutellata* foi capturada em maior abundância e distribuída em todos os ambientes onde foram realizadas as capturas, tanto com armadilhas Disney quanto com armadilha de luz (CDC). Este fato vem reforçar os registros de *L. flaviscutellata*, no Pará, onde a espécie parece está adaptada a diferentes tipos de vegetação, tais como: florestas primárias e secundárias e vegetação do tipo capoeira. Esta embora apresente pouca antropofilia, é de grande importância por seu papel na manutenção do ciclo enzoótico primitivo da *L. (L.) amazonensis*. (Ready *et al.*, 1983). A espécie *L. flaviscutellata*, foi a única espécie registrada em todos os meses com os dois métodos de captura, atingindo picos de dezembro a abril, que correspondem ao período chuvoso na região. Verifica-se que o número de casos de leishmaniose tegumentar americana tem correspondência direta com o índice pluviométrico na região de Manaus. Atribuindo-se que esse fenômeno deva-se ao aumento da densidade dos vetores nas florestas (Boecken, 1996; Guerra *et al.*, 2006).

A taxa de infecção nos vetores naturalmente infectados nas áreas endêmicas e a identificação correta do agente etiológico são de grande importância na epidemiologia das leishmanioses (Michalsky *et al.*, 2002). Na área da Reserva de Campina, 207 fêmeas foram dissecadas não sendo observada infecção por

leishmânia. Vários estudos realizados no Brasil mostram as dificuldades envolvidas em detectar *Leishmania* em flebótomos naturalmente infectados. No estado de Ceará, foi relatada uma taxa de infecção natural de 0,42%, de 10.612 fêmeas dissecadas, 44 apresentavam infecção natural por flagelados (Queiroz *et al.*, 1994); Em Mato Grosso do Sul, foi registrada a taxa de somente 0,15% (1/680) (Galati *et al.*, 1996); No estado do Paraná, de 12.930 fêmeas coletadas, 2.487 foram dissecadas, mas apenas uma fêmea apresentou infecção natural (Neitzke *et al.*, 2008). Feitosa e Castellón (2004) no Amazonas e Castro *et al.* (2005) no Paraná, não encontraram infecção natural por flagelados em 156 e 2.559 fêmeas dissecadas, respectivamente. No estado de São Paulo, de 5.448 fêmeas dissecadas, não foi detectado nenhum inseto infectado por flagelados (Silva e Gomes, 2001). A ausência da infecção natural nas fêmeas dissecadas neste estudo poderia, parcialmente, ser explicada pela dissecação de fêmeas nulíparas e, possivelmente, pelo baixo número de reservatórios naturais de *Leishmania* presentes na área.

O método para a pesquisa da infecção natural de flebotomíneos por dissecação e observação de flagelados no trato digestório requer a confirmação da infecção pelo cultivo de *Leishmania in vitro* ou inoculação em animais de laboratório (Michalsky, 2002), enquanto os métodos moleculares permitem a identificação de espécies de *Leishmania* isoladas em culturas, de pacientes ou reservatórios, bem como de flebotomíneos (Medeiros, 2002). As principais vantagens dos métodos moleculares são a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio e localização da *Leishmania* no trato digestório do vetor (Michalsky, 2002; Medeiros, 2002; Pita-Pereira, 2005). Atualmente esta técnica tem sido empregada largamente na tentativa de verificar com segurança a infecção natural em flebótomos. A taxa de infecção parasitária por *Leishmania*, com teste de LnPCR, encontrada na Reserva de Campina é considerada alta (11,76% para *L. flaviscutellata*; 15,38% para *L. georgii* e 20,0% para *L. o. nociva*), quando comparada com estudos realizados em outras áreas. No Maranhão, em teste de 1.100 fêmeas, agrupadas em *pools* de 10 indivíduos, foi verificado que quatro *pools* estavam positivos, sendo a taxa de infecção natural por espécie de 0,4% (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006); No Peru, em teste de 5.861 fêmeas, divididas em 713 *pools* verificou-se que, somente 8 (0.14%) foram contaminados por *Leishmania* (Pérez *et al.*, 1994); Nas coletas, no estado do Paraná, das 12.930 fêmeas, 1.230 foram submetidas à PCR, não sendo detectada a

presença de DNA de *Leishmania* em nenhuma fêmea (Neitzke *et al.* (2008). Como não havia sangue no trato digestório dos espécimes testados, pôde-se observar que há circulação de leishmânias na Reserva de Campina, principalmente circulando entre os três ambientes através de *L. flaviscutellata*. É possível que a infecção de *L. georgii*, detectada pela Ln-PCR, esteja relacionada a alguma espécie de leishmânia não patogênica ao homem ou que estivesse somente albergando o parasita, uma vez que essa espécie não é incriminada como vetora de *Leishmania*. Porém ainda existem lacunas quanto à espécie transmissora de *L. (V.) braziliensis* no Amazonas.

A utilização de animais sentinelas com o objetivo de monitorar e averiguar a circulação de leishmânias numa área tem sido empregada por alguns autores. No presente estudo foi feita a utilização 3 hamsters (*Mesocricetus auratus*) sentinelas, pelo período de 12 meses. Em nenhum dos animais foi verificada infecção nos métodos utilizados, possivelmente pelo fato de ter sido utilizado um animal introduzido e não um silvestre. O fato de não se observar infecção nos animais sentinelas, não exclui a circulação de leishmânias na área estudada. A baixa taxa de infecção em animais sentinela também foi registrada na Zona da Mata em Pernambuco, quando foram utilizados 48 hamsters e somente um indivíduo apresentou positividade para *Leishmania*, sem que tenha sido possível a identificação da espécie (Almeida *et al.*, 2005). Na Venezuela foram utilizados 33 hamsters, que foram expostos durante um ano, sendo feito testes sanguíneos por PCR e 24 apresentaram positividade. Porém não é descartada a hipótese de que as alterações na floresta, que provocam a restrição de espaços ecológicos para os flebotomíneos, possam provocar mudanças de hábitos. Os flebotomíneos que vivem em ambientes modificados se alimentam do sangue de seus hospedeiros mamíferos remanescentes nas matas residuais, e o homem ou animais que vivem no peridomicílio podem servir para repasto sanguíneo (Paes, 1991).

6. CONCLUSÃO

√ Este estudo, possibilitou analisar a abundância, diversidade e riqueza da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de Reserva Biológica de Campina em três ambientes com diferentes características ecológicas ao longo de um período de 12 meses. Concluindo que:

√ A fauna de flebotomíneos da Reserva Biológica de Campina apresenta uma diversidade variável de acordo com o ambiente, com baixa diversidade de espécies e riqueza em áreas de campina e campinarana, comparada com a floresta primária;

√ A espécie *Lutzomyia flaviscutellata* foi a mais abundante e dominante na área da Reserva Biológica de Campina, o que demonstra seu poder de adaptação a diferentes ambientes com variados tipos de vegetação e solo;

√ Na Reserva Biológica de Campina verifica-se infecção natural de flebotomíneos por protozoários do gênero *Leishmania*, demonstrando-se a circulação de ciclo enzoótico primário da leishmaniose tegumentar nesta área, provavelmente mantido pela espécie *L. flaviscutellata* e *L. o. nociva*;

√ A espécie *Lutzomyia flaviscutellata* apresentou maior abundância na área de Reserva Biológica de Campina, durante o período das chuvas, reduzindo-se durante a estiagem, fato que coincide com o aumento na incidência de casos de leishmaniose devido a elevada densidade dos vetores neste período favorecendo a via de transmissão;

√ A Reserva Biológica de Campina localizada no km 42 da Br 174 – Manaus- Boa Vista, é caracterizada por ilhas de vegetação formando ambientes denominados como campina e campinarana, onde observa-se a presença de solo pobre em nutrientes minerais e vegetação baixa e arbustiva, é um ambiente que possibilita a ocorrência de espécies de flebotomíneos que possuem ampla distribuição geográfica, ampla valência ecológica e até com habitats variados devido

a capacidade de adaptação a diferentes tipos de ambientes, como ocorre com *Lutzomyia flaviscutellata* (espécie eurítropa) que foi capturada em todos os ambientes durante todos os meses do ano;

√ Este é um estudo pioneiro no que diz respeito ao levantamento da fauna de flebotomíneos em áreas de campina e campinarana na região amazônica, assim como, da ocorrência de espécies de vetores e da circulação de protozoários do gênero *Leishmania* em ecótopos com características distintas das florestas de terra firme que caracterizam os ambientes comumente presentes nos estudos de dinâmica das Leishmanioses na região amazônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agami, R.; Aly, R.; Halman, S.; Shapira, M. 1994. Functional analysis of cis-acting DNA elements required for expression of the SL RNA gene in the parasitic protozoan *Leishmania amazonensis*. *Nucl. Acid Res.*, 22, 1959-65.
- Aguiar, G. M e Medeiros, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. *In: Rangel, E. E.; Lainson, R.. Flebotomíneos do Brasil*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003
- Anderson, A. B; Prance, G. T.; Albuquerque, B. W. P. 1975. Estudos sobre a vegetação das Campinas Amazônicas III. A vegetação lenhosa da Campina da Reserva Biológica INPA – SUFRAMA (Manaus-Caracaraí, km 62). *Acta Amazonica* 5 (3): 225-246.
- Andrade Filho, J. D.; Valente, M. B.; Andrade, W. A.; Brazil, R. P.; Falcão, A. L. 2001. Flebotomíneos do estado de Tocantins, Brasil (Diptera:Psychodidae). *Rev Soc Bras Méd Trop*, 34(4):323-329.
- Andrade, M. S. 2004. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na zona da mata de Pernambuco, Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Departamento de Saúde Coletiva. *Dissertação de Mestrado*. 90pp.
- 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. *Appl Envi Microbiology* 66: 1933-1938, 2000.
- Arias, J. R. e Freitas, R. A. 1977. Flebotomos da Amazônia Central do Brasil. I. Resultados obtidos de capturas feitas com iscas humana e equina (Diptera, Psychodidae). *Acta Amazonica*. 7: 507-527.

- Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1978. Sobre os Vetores de Leishmaniose Cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2- Incidência de Flagelados em Flebótomos Selváticos. *Acta Amazonica*, 8(3): 387-396.
- Bañuls, A.; Jonquieres, R.; Guerrini, F.; Le Pont, F.; Barrera, C.; Espinel, I.; Guderian, R.; Echeverria, R.; Tybairenc, M. 1999. Genetic analices of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? *Am J Trop Med Hyg*, v. 61(5), p.838-845.
- Barrett, T. V.; Freitas, R. A.; Albuquerque, M. I. C.; Guerrero, J. C. H. 1996. Report on a collection of *Lutzomyia* sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brasil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 9(1): 27-35.
- Barretto, M. P. 1943. Observação sobre a biologia em condições naturais, dos flebótomos do estado do São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Concurso à docência livre da cadeira de parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. 162pp.
- Boecken, G. H. 1996. New World tegumental leishmaniasis in Brazil: with special reference to the situation of the disease in Manaus Central Amazon Basin [Dissertação de Mestrado]. London: University of London.
- Braga, M. N. e Braga, P.I.S. 1975. Estudo sobre a vegetação das Campinas Amazônicas IV. Estudos ecológicos na Campina da Reserva Biológica INPA-SUFRAMA (Manaus- Caracará, km 62). *Acta Amazonica* 5 (3): 247-260.
- Brandão-Filho, S. P. 2001. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco. Recife. Brasil. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo. 102 pp.
- Brandão-Filho, S. P. ; Campbell-Lendrum, D. ; Brito, M. E. F. ; Shaw, J. J. ; Davies, C. R. 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, United Kingdon, v. 93, p. 488-494.

- Brandão-Filho, S. P. ; Shaw, J. J. 1994. Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology Today*., United Kingdon, v. 10, n. 9, p. 329-330.
- Brandão-Filho, S. P. ; Valença, H. F.; Almeida, É. L.; Brito, M. E. F.; Almeida, F. A.; Ishikawa, E. ; Cupolilo, E. ; Shaw, J. J. 2003. Infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil.. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003, Belém, Pará. *Ver Soc Bras Med Trop*, v. 36. p. 396-396.
- Cabanillas, M. R. S.; Castellón, E. G. 1999. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of Ducke Forest Reserve, Manaus, Am, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 289-296.
- Castellón, E. G.; Araújo Filho, N. A.; Fé, N. F. e Alves, J. M. C., 1991. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) no Estado de Roraima, Brasil. II. Espécies coletadas na região Norte. *Acta Amazonica*, 21:45-50.
- Castellón, E. G.; Araújo Filho, N. A.; Fé, N. F.; Alves, J. M. C. 1989. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado de Roraima, Brasil. I. Espécies coletadas nas regiões Sul e Central. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 84, Supl. IV, 95-99.
- Christensen, H. A.; Arias, J. R.; Vasquez, A. M.; Freitas, R. A. 1982. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Am J Trop Hyg* 31(2): 239-242.
- Christensen, H.; Herrer, A. 1979. Susceptability of sandflies (Diptera: Psychodidae), to trypanosomatidae from two-toed sloths (Edentata: Bradypodidae). *J Med Entomol*, 16: 424-427.
- Christophers, S. R. 1911. The development of the egg follicle in Anophelines. *Paludism*. 2: 73-78.
- Coen, E. S.; Thoday, J. M.; Dover, G. 1982. Rate of turnover of variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 295: 564-568.

- Corn, J. L.; Comer, J. A.; Erickson, G. A.; Nettles, V. F. 1990. Isolation of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype from phlebotomine sandflies in Georgia. *Am J Trop Med Hyg*, 42: 476-482.
- Cupollilo, E.; Momen, H., Grimaldi, G. Jr. 1998. Genetic Diversity: Natural Populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.93(5), p.663-668.
- Cupolillo, E.; Grimaldi, G. Jr.; Momen, H. 1994. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Tro Med Hyg*, v.50, n.3, p.296-311.
- Degrave, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U. 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- Delgado, O.; Cupolillo, E.; Bonfante-Garrido, R.; Silva, S.; Belfort, E.; Grimaldi, G. Jr.; Momen, H. 1997. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.92, p.581-582.
- Dias-Lima, A. G.; Castellón, E. C.; Medeiros, J. F.; Sherlock, I. A. 2003. Estratificação vertical da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública*, 18 (3): 823-823.
- Dias-Lima, A. G.; Castellón, E. C.; Sherlock, I. A. 2000. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Estação Experimental de Silvicultura Tropical Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*. 33(2): 303-316.
- Disney, R. H. L. 1966. A trap for phlebotominae sandflies attracted to rats. *Bull. Ent. Res.*, 56: 445-451.
- Fé, N. F.; Freitas, R. A.; Barrett, T. V. 1998. Phlebotomine Sand Flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a Description of

Lutzomyia (Psychodopygus) douradoi n. sp. (Diptera : Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 93: 331-336.

- 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 Amazonica*. Vol. 34 (1): 121-127.
- 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 composition. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(1): 119-124.
- Fernandes, O.; Santos, S. S.; Cupolillo, E.; Mendonça, B.; Derre, R.; Junqueira, A. C.; Santos, L. C.; Sturm, N. R.; Naiff, R. D.; Barrett, T. V.; Campbell, D. A.; Coura, J. R. 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95(1):97-9.
- Fernandes, O.; Mangia, R. H.; Lisboa, C. V.; Pinho, A. P.; Morel, C. M.; Zingales, B.; Campbell, D. A.; Jansen, A. M. 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 118(Pt2):161-6.
- Fernandes, O.; Souto, R. P.; Castro, J. A.; Pereira, J. B.; Fernandes, N. C. ; Junqueira, A. C.; Naiff, R. D.; Barrett, T. V.; Degraeve, W.; Zingales, B.; Campbell, D. A.; Coura, J. R. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58(6):807-11.
- Fernandes, O.; Murthy, V. K.; Kurath, U.; Degraeve, W. M.; Campbell, D. A. 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66:261-271.
- Fernandes, O.; Degraeve, W. M.; Campbell, D. A. 1993. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitology*. 107:219-224.

- Fernandes, O.; Souto, R. P.; Castro, J. A.; Pereira, J. B.; Fernandes, N. C. ; Junqueira, A. C.; Naiff, R. D.; Barrett, T. V.; Degraeve, W.; Zingales, B.; Campbell, D. A.; Coura, J. R. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58(6):807-11.
- Fisher, R. A; Corbet, A. S.; Williams, C. B. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *Jour. Anim. Ecol.*, London, 12: 42-58.
- Forattini, O. P. 1973. *Entomologia Médica IV*. Psychodidae. Phlebotominae, Leishmaniose e Bartonelose. Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo. VIII: 658p.
- Franco, A. M. R. 1995. Caracterização Biológica e Molecular de parasitas do gênero *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Tese apresentada à Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação do Instituto Oswaldo Cruz, RJ, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Curso de Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
- Franco, A. M. R.; Grimaldi Jr., G. 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae), a unique parasite infecting the Neotropical tree sloths (Edentata). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94: 261-268.
- Freitas, J. V.; Higuchi, N. 1993 . Projeções da Distribuição Diamétrica de uma Floresta Tropical Úmida de Terra-firme pela Cadeia de Markov. *In: I Congresso Florestal Panamericano e VII Congresso Florestal Brasileiro*. Curitiba, PR. Anais do I Congresso Florestal Panamericano e VII Congresso Florestal Brasileiro. São Paulo : SBEF e SBS. 2: 545-548.
- Freitas, R. A.; Barrett, T. V. 1999. *Lutzomyia derelicta* (Diptera: Psychodidae) a singular new phlebotomine sand fly from an inselberg in northeastern Amazônia. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 3, p. 629-633.
- Fundação de Medicina Tropical: [http:// www.fmt.am.gov.br/imprensa/leishsurto.htm](http://www.fmt.am.gov.br/imprensa/leishsurto.htm). Acesso em: 30.10.08.

- Galati, E. A. B. 2003. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. *In*: Rangel, E. F.; Lainson, R, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 53-175.
- Gomes, L. H. M. ; Nery, L. C. ; Pinheiro, F. G. ; Freitas, R. A. ; Franco, A. M. R. 2009. Fauna de flebotomíneos (Diptera:Psichodidae: Phlebotominae) em terra-firma e planície fluvial na área de influencia Coaria-Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 323-326.
- Gomes, A. C.; Yoshimi, I. Y.; Capinzaiki, A. N.; Amaral, N. M. M. e Guimarães, A. J. G., 1992. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana nº 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos Municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. *Ver. Inst de Medic Trop*, 34:149-158.
- Grimaldi Jr., G.; Tesh, R. B. e MacMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, 41: 687-725.
- Grimaldi, G. e Tesh, R. B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbio Review*, 6: 230-250.
- Grisard, E., Steindel, M., Shaw, J. J., Ishikawa, E. A. Y., Carvalho-Pinto, C. J.; Eger-Mangrich, I.;Toma, H. K.; Lima, J. H.; Romanha, A. J.; Campbell, D. A. 2000. characterization of *Leishmaniasp.* strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop.* 74, 89-93.
- Guerra, J. A. O.; Ribeiro, J. A. S.; Coelho, L. I. A. R. C.; Barbosa, M. G. V.; Paes, M. G. 2006. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saú Pub* Rio de Janeiro. 2: 11.
- Guevara, P; Alonso, G.; Franco da Silveira, J; Mello, M; Scorza, J. V.; Añez ,N; Ramírez, J. L. 1992. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol*, 56: 15-26.

- Hassan, M. Q.; Ghosh, A.; Ghosh, S. S.; Gupta, M.; Basu, D.; Mallik, K. K.; Adhya, S. 1993. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology*, 107: 509-517.
- Jamjoom, M. B.; Ashford, R. W.; Bates, P. A.; Chance, M. L.; Kemp, S. J.; Watts, P. C.; Noyes, H. A. 2004. *Leishmania donovani* is only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology.*, v.129, p.399-409.
- Katakura, K.; Kawazu, S. I.; Sanjyoba, C; Naya, T.; Matsumoto, Y; Ito, M.; Nagakura, K.; Aikawa, M.; Hashiguchi, Y. 1998. *Leishmania* mini-exon gene for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. *Tokai J Exp Clin Med* 23: 393-399.
- Katakura, K.; Mimori, T.; Furuya, M.; Uezato, H.; Nonaka, S.; Gomez, E. A.; Hashiguchi, Y. 2003. Identification of *Endotrypanum* sp. from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR and sequencing of the mini-exon gene. *J Vet Med Sci*, 65: 649-653.
- Kawa, H. e Sabroza, P. C. 2002. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública*, 18:853-865.
- Kebede, A.; De Doncker, S.; Arevalo, J.; Ray, D. Lê.; Dujardin, J. C. 1999. Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Viannia*. *Parasitology*, 29:549-557.
- Klinge, H. 1965. Podzol soils in the Amazon Basin. *J. Soil.Sci.*, 16:96-103.
- Lainson, R. e Shaw, J. J. 1987. Evolution, Classification and Geographical Distribution. In: Peterrs,W. e Killick-Kendrick, R. *The leishmaniasis in Biology e Medicine*. London: Academic Press. v. 1, cap.1, p. 1-119.

- Lainson, R.; Shaw, J. J. 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 64, p.3-9.
- Lainson, R.; Shaw, J. J. 1972. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin*, 28: 44-48.
- Lainson, R.; Shaw, J. J. 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência e Cultura .Jour of the Braz Assoc for Adv of Scie*, 44(2/3).
- Lainson, R.; Shaw, J. J.; Silveira, F. T.; Souza A. A.; Braga, R. R.; Ishkawa, E. A. Y. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 89(3): 435-443.
- Lainson, R.; Shaw, J. J. 1998. New World leishmaniasis _ The Neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Baeows, M Sussman (eds), *Microbiology and Microbial Infections*. 5: 241-266.
- Lainson, R.; Ward, R. D.; Young, D. G.; Shaw, J. J. e Fraiha, H. 1976. Preliminary entomological and parasitological studies in Humboldt, Aripuana, Mato Grosso State, Brazil. *Acta Amazonica*. 6: 55-60 (Suppl.)
- Marcondes, C. B.; Santos-Neto, L. G. e Lozovei, A. L. 2001. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(3):255-260.
- Marsden, P., 1986. Mucosal leishmaniasis ("Espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80:859-875.
- Martins, A. V.; Willians, P. e Falcão, A. L. 1978. *American Sandflies* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Martins, A. V.; Falcão, A. L.; Silva, J. E. 1965. Notas sobre os flebótomos do território de Rondônia, com a descrição de seis espécies novas (Diptera, Psychodidae). *Rev Bras Biol* 35: 1-20.

- Marzochi, M. C. A. 1992. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jorn Bras Medicina*, 63:82-104.
- Marzochi, M.C.A. 1989. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In *Grandes Endemias Brasileiras*, Universidade de Brasília, Brasília.
- Medeiros, A. C. R.; Rodrigues, S. S.; Roselino, A. M. F. 2002. Comparison of the especificifcity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 421-424, 2002.
- Mer, G. G. 1936. Experimental study on the development of the ovary in *Anopheles elutus*. Edew. (Diptera: Culicidae) *Bull Enomol Res.* 27: 351
- Michalsky, E. M.; Fortes-Dias, C. L.; Pimenta, P. F. P.; Secundino, N. F. C.; Dias, E. S. 2002. Avaliação da PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 44, 255-259.
- MS (Ministério da Saúde), 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde. Rede internacional de informações para a saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. <http://tabnet.datasus.gov.br/> (acessado em 15/06/2009).
- Murphy, V. K.; Dibbern, K. M.; Campbell, D. A. 1992. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes*, 6 (3):327-43.
- Neitzke, H. C.; Scodro, R. B. L.; Castro, K. R. R.; Sversutti, A. C. D.; Silveira, T. G. V.; Teodoro. U. 2008. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 41:1

- Noyes, H. A.; Reyburn, H.; Bailey, J. W.; Smith, D. 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology
- 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. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(6):540-543.
- Paes, M. G. 1991. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera: Psychodidae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazonas, Brasil). *Dissertação de Mestrado*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 128pp
- Paiva, B. R.; Secundino, N. F. C.; Nascimento, J. C.; Pimenta, P. F. P.; Galati, E. A. B.; Andrade Junior, H. F.; Malafronte, R. S. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, v. 99, p. 252–25.
- Perez, J. E.; Ogusuku, E.; Ingá, R. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. roy. Soc. trop. Med.*, 88: 161-164.
- Pessoa, F. A. C. 2000. Efeitos da extração seletiva de madeira sobre flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em uma floresta de produção: Abundância relativa das espécies em troncos de árvores e prevalência de Tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Dissertação de Mestrado*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 88pp.
- Pessoa, S. B.; Martins, A. V. 1982. *Parasitologia Médica*, 11^a ed., Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 872 p.
- Piarroux, R. Azaiez, R.; Lossi, A. M.; Reynier, P.; Muscatelli, F.; Fontes, M.; Dumon, H.; Quilici, M. 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am Jour Trop Med and Hyg*, 49(3): 364-369.

- Pinheiro, F. G. 2004. Infecção Natural em *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado do Amazonas, Brasil. *Dissertação de Mestrado*.
- Pita-Pereira, D.; Alves, C. R.; Souza, M. B.; Brazil, R. P.; Bertho, A. L.; Barbosa A. F.; Britto, C. C. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 99: 905-913.
- Queiroz, R. G.; Vasconcelos, I. A.; Vasconcelos, A. W.; Pessoa, F. A.; de Sousa, R. N.; David, J. R. 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am J Trop Med Hyg* 50: 693-698.
- Rangel, E. F.; Lainson, R. 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 368 p.
- Ready, P. D.; Lainson, R.; Shaw, J. J. 1983. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of "enzootic rodent leishmaniasis" (*Leishmania mexicana amazonensis*), and apparent absence of "pian-bois" (*Le. braziliensis guyanensis*) in plantations of introduced tree species and in other non-climax forest in eastern Amazonia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 775-785.
- Ready, P. D.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Ward, R. D. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward e Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bull Ent Res*, 76:21-40.
- Rey, L. O. 2001. Complexo *Leishmania braziliensis* e a Leishmaniose tegumentar americana. In: *Parasitologia*. 3ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. P.182-192.

- Ribeiro, M. N. G e Santos, A. 1975. Observações climatológicas no Ecossistema Campina Amazônica. *Acta Amazonica*, Manaus 5 (2): 183-189.
- Rodgers, M. R.; Popper, S. J.; Wirth, D. F. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 71:267-275.
- Rojas, E.; Scorza, J. V.; Espinoza, A. 1995. Excretion of promastigotos of *Leishmania pifanoi* by experimentally infected *Lutzomyia youngi*. *Rev Saúde Pública*, v. 29 (6), p.496-502.
- Ryan, L. 1986. Flebótomos do Pará, Brasil. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Ministério da Saúde, Fundação SESP, Instituto Evandro Chagas, Belém, *Documento Técnico*. Nº 1, 154 p.
- Santana, G. M. S. 2001. Eosinophils in Human cutaneous Leishmaniasis; Increased cell numbers and expression of activation markers. In: XXVI meeting of the Brazilian society of Immunology. Campos do Jordão. *Rev Soc Bras Immun.* v. 34. p. 89-89.
- Schwenkenbecher, J. M.; Frohlich, C.; Gehre, F.; Schnur, L. F.; Schonian, G. 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infect Genet Evol*, v. 4, p.99-105.
- Shaw, J. J. 1992. *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? *Ciência e Cultura*, 44: 107-116.
- Shaw, J. J. e Lainson, R. 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London. *Academic Press*.
- Shaw, J. J. e Lainson, R. 1968. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower Amazon region – the feeding habitats of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata*, in reference to man, roedents and other animals. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 62; 396-405.

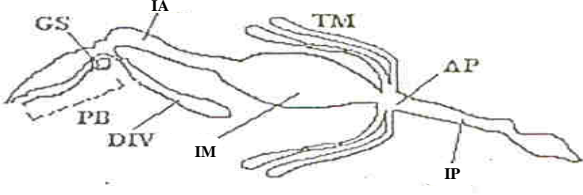
- Silva, A. C.; Gomes, A. C. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 187-191
- Silva, D. F.; Freitas, R. A.; Franco A. M. R. 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neot Entomology*, 36: 138-144, 2007.
- Silva, A. C. e Gomes, A. C. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 34, 187-191.
- Silveira, F. T.; Ishikawa, E. A.; De Souza, A. A. A.; Lainson, R. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 9:43-50.
- Silveira, F. T., Souza, A. A., Lainson, R., Shaw, J. J., Braga, R. R., Ishikawa, E. A. 1991 a. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region: Natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Rio de Janeiro, v. 86 p. 127-130.
- Silveira, F. T., Lainson, R.; Shaw, J. J., Braga, R. R.; Ishikawa, E. A.; Souza, A. A. 1991 b. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no Estado do Pará, Brasil. *Rev. Inst Med Trop São Paulo*. São Paulo, v. 33 p. 18-22.
- Silveira, F. T.; Shaw, J. J.; Braga, R. R.; Ishikawa, E. A. 1987. Dermal leishmaniasis in the amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannaia) lainsoni* sp.N., a new parasite from the state of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:289–292
- Simpson, L.; Morel, C. e Simpson, A. M. 1980. Biological role of extrachromossomal DNA. *In: Modern Genetic Concepts and Techniques in the Study of Parasites*. Ed. Frank Michal, *Trol Disea Rese Series*, 4: 65 - 82.

- Smyth, A. J.; Ghosh, A.; Hassan, Md. Q.; Basu, D.; De Bruijn; Adhya, S.; Mallik, K. K.; Barker, D. C. 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, 105: 183-192.
- Souza, M. A.; Pereira, S. M. C.; Côrte-Real, S. 1997. *Leishmania major*: Parasite Interactions suggesting Sexuality. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.92, n.6, p. 761-766.
- Sturm, N. R.; Maslov, D. A.; Grisard, E. C.; Campbell, D. A. 2001. Diplonema spp. Process spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *J Eukaryot Microbiol*, 48: 325-331.
- Sturm, N. R.; Yu, M. C.; Campbell, D. A. 1999. Transcription termination and 3'end processing of the spliced leader RNA in Kinetoplastids. *Mol Cell Biol*, 19:1595-1604.
- Sudia, W. D. e Chamberlain, R. W. 1962. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News*. 22: 126-129.
- Talhari, S.; Arias, J. A.; Cunha, M. G. S.; Naiff, R. D.; Naiff, M. F.; Freitas, R. A. e Barrett, T. 1988. Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol* 63(6): 433-438.
- Travi, B. L.; Adler, G. H.; Lozano; M.; Cadena, H.; Montoya-Lerma, J. 2002. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol* 39: 451-456.
- Uliana, S. R. B.; Affonso, M. H. T.; Camargo, E. P.; Floeter-Winter, L. M. 1991. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exper Parasit* 72:157-163, 1991.
- Vásquez, L.; Sierra, D.; Rojas, E. 2002. Mecanismos de transmisión de la leishmaniasis. *Rev Soc Venez e Microbiol*, v. 22 (2).

- Walters, L. L.; Chaplin, G. L.; Modi, G. B.; Tesh, R. 1989. Ultrastructural biology of *Leishmania* (Viannia) *panamensis* in *Lutzomyia gomezi* (Diptera:Psychodidae) a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg*, v.40, p. 19-39.
- Warburg, A. 1991. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. *J Inv Pathol* 58: 1889-202.
- Ward, R. D. e Fraiha, H. 1977. *Lutzomyia umbratilis*, a new species of sand fly from Brazil (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 14(3):313-317
- Weiss, J. B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbi Rev*, 8(1): 113-130.
- Wetzel, R. M. e Avila-Pires, F. D. 1980. Identification and distribution of the recent sloths of Brazil (Edentata). *Rev Brasil Biol*, 40: 831-836.
- 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 American (Diptera: Psychodidae). *Assoc Pub Am Ent Inst, Mem of the Amer Entom Inst*, n° 54, 881p.
- Yu, M. C.; Orlando, T. C.; Sturm, N. R.; Zhou, L.; Saito, R. M.; Floeter-Winter, L. M.; Campbell, D. A. 2002. Two distinct functional spliced leader RNA gene arrays in *Leishmania tarentolae* are found in several lizard *Leishmania* species. *Int J Paras*, 32: 1411-1422.

8. ANEXOS

01. FICHA DE DISSECÇÃO

	<p>FLEBÓTOMOS EXAMINADOS</p> <p><i>LOCAL:</i> _____</p> <p>MÉTODO DE CAPTURA:</p> <p>_____</p> <p>DATA: ____ / ____ / ____</p>
---	---

O R D E M	Conteúdo Estomacal				Condições dos ovariolos	EXAM + / -	Locais Parasitados							Ident. do flebotomo	
	SF	SD	SS	AÇ	1 - sem visualização		ΔP	TM	IA	IM	IP	DIV	PB		GS
					2 - oócitos nas fases II e III										

+01 à 05 p/ campo	<p>Obs: ΔP – Triângulo Posterior; TM - Tubo de Malpighi; IA - Intestino Anterior; IM- Intestino Médio; IP - Intestino Posterior; DIV - Divertículo; PB - Peças Buciais; GS - Glândulas salivares; SF – Sangue fresco; SD – Sangue em Decomposição; SS – Sem Sangue; AÇ – Açúcares</p>
++06 à 20 p/ campo	
+++21 à 40 p/ campo	
++++41 à n p/ campo	

02. Reação de PCR

Preparo do Master Mix – Reação 1

Item (sol.)	Volume
Tampão de PCR – (2mM MgCl ₂) 10 X	5,0 uL
MgCl ₂ 10mM (Biotools BeM Lab., S.A)	1,0 uL
DMSO	5,0 uL
dNTPs 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,5 uL
Mix I Leish.mini-exon 15 pmol/uL	1,0 uL
Tth DNA polimerase 1U/uL	0,5 uL
Agua dd	26,0 uL
DNA de flebótomos	10,0 uL
Volume total	50,0 uL

*Todos os reagentes foram Invitrogen Brasil

Preparo do Master Mix – Reação 2

Item (sol.)	Volume
Tampão de PCR – (2mM MgCl ₂) 10 X	5,0 uL
MgCl ₂ 10mM (Biotools BeM Lab., S.A)	1,0 uL
DMSO	5,0 uL
dNTPs 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,5 uL
Mix II Leish.mini-exon 15 pmol/uL	1,0 uL
Tth DNA polimerase 1U/uL	1,4 uL
Agua dd	33,1 uL
Produto amplificado na 1 ^a reação	2,0 uL
Volume total	50,0 uL

*Todos os reagentes foram Biotools B e L Laboratories, S.A, Madrid, Spain.

03. Listagem de indivíduos capturados na área da Reserva Biológica de Campina.

Nº de registro	Espécies	Área	Método	Presença de Sangue
3	<i>L. flaviscutellata</i>	CA	CDC	SS
4	<i>L. flaviscutellata</i>	CA	CDC	SS
20	<i>L. flaviscutellata</i>	CN	Disney	SS
23	<i>L. flaviscutellata</i>	CN	Disney	SS
47	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	CDC	SS
59	<i>L. flaviscutellata</i>	CN	Disney	SS
166	<i>L. flaviscutellata</i>	CA	Disney	SS
175	<i>L. georgii</i>	MT	CDC	SS
180	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	CDC	SS
206	<i>L. georgii</i>	MT	CDC	SS
225	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
227	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
230	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
232	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
233	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
234	<i>L. o nociva</i>	MT	Disney	SS
238	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
253	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	Disney	SS
309	<i>L. flaviscutellata</i>	MT	CDC	SS
311	<i>L. flaviscutellata</i>	CN	CDC	SS
378	<i>L. o nociva</i>	MT	CDC	SS
412	<i>L. flaviscutellata</i>	CN	CDC	SS

ss= sem sangue

04. Denominação das espécies segundo classificação dos autores Young e Duncan (1994) e Galati (1995).

Classificação segundo: Young e Duncan, 1994	Classificação segundo: Galati, 1995
<i>Lutzomyia antunesi</i> <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> <i>Lutzomyia o. nociva</i> <i>Lutzomyia umbratilis</i>	<i>Nyssomyia antunesi</i> <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> <i>Bichromomyia o. nociva</i> <i>Nyssomyia umbratilis</i>
<i>Lutzomyia ayrozai</i> <i>Lutzomyia clautrei</i> <i>Lutzomyia davisii</i> <i>Lutzomyia paraensis</i> <i>Lutzomyia squamiventris</i>	<i>Psychodopygus ayrozai</i> <i>Psychodopygus clautrei</i> <i>Psychodopygus davisii</i> <i>Psychodopygus paraensis</i> <i>Psychodopygus squamiventris</i>
<i>Lutzomyia georgii</i> <i>Lutzomyia inpai</i> <i>Lutzomyia monstrosa</i>	<i>Evandromyia georgii</i> <i>Evandromyia inpai</i> <i>Evandromyia monstrosa</i>
<i>Lutzomyia furcata</i> <i>Lutzomyia tuberculata</i>	<i>Viannamyia furcata</i> <i>Viannamyia tuberculata</i>
<i>Lutzomyia trichopyga</i> <i>Lutzomyia raticliffei</i>	<i>Trichopygomyia trichopyga</i> <i>Trichopygomyia raticliffei</i>
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>
<i>Lutzomyia nematoducta</i> <i>Lutzomyia sordellii</i>	<i>Sciopemyia nematoducta</i> <i>Sciopemyia sordellii</i>
<i>Lutzomyia aragaoi</i> <i>Lutzomyia shannoni</i>	<i>Psathyromyia aragaoi</i> <i>Psathyromyia shannoni</i>
<i>Lutzomyia sericea</i>	<i>Evandromyia sericea</i>

05. Preferência alimentar e habitat das espécies capturadas na Reserva Biológica de Campina.

Espécies	Habitat												Antropofilia		
	F	TT	T	TR	O	C	FR	G	SN	M	AD	D	Alta	Média	Baixa
<i>L. antunesi</i> #		x	x	x		x				x	x				x
<i>L. aragaoi</i>		x		x	x										
<i>L. ayrozai</i> #	x			x						x			x		
<i>L. clausurei</i>									x	x					
<i>L. davisii</i> #	x	x	x	x						x		x			
<i>L. flaviscutellata</i> #	x	x		x							x	x			x
<i>L. furcata</i>		x	x	x	x						x				
<i>L. georgii</i>															
<i>L. inpai</i>									x						
<i>L. monstruosa</i>		x	x	x							x				
<i>L. nematoducta</i>									x						
<i>L. olmeca nociva</i> #	x														x
<i>L. paraensis</i> #		x									x				x
<i>L. raticliffei</i>									x						
<i>L. sericea</i>									x						
<i>L. shannoni</i>				x	x	x				x	x	x			
<i>L. sordellii</i>			x	x	x		x	x			x	x			
<i>L. squamiventris</i> #									x	x	x		x		
<i>L. trichopyga</i>			x												
<i>L. tuberculata</i>		x	x	x	x						x				x
<i>L. ubiquitous</i> #		x	x	x	x										x
<i>L. umbratilis</i> #				x		x							x		

F= folhas caídas; TT: toca de tatu; T; Toca de outros animais; TR: troncos e raízes; O: oco de árvore; C: copa de árvores; FR: fendas nas rochas; G: grutas; SN: floresta sem notificação do local; M: áreas marginais; AD: anexos de animais domésticos (galinheiro, chiqueiro, currais, etc.); D: paredes internas e externas de domicílios; #: Espécies veiculadoras de leishmânias patogênicas ao homem (adaptação de Aguiar *et al.*, 1987).