



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

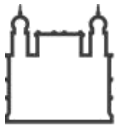
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES DE SAÚDE  
NA AMAZÔNIA – PPGVIDA**

**REBECA CRISTINA DE SOUZA GUIMARÃES**

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* EM FLEBOTOMÍNEOS DE  
UM ASSENTAMENTO RURAL NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

**MANAUS – AM**

**2019**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD**

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES DE SAÚDE  
NA AMAZÔNIA – PPGVIDA**

**REBECA CRISTINA DE SOUZA GUIMARÃES**

**ASPECTOS ECOLÓGICOS E DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* EM FLEBOTOMÍNEOS DE  
UM ASSENTAMENTO RURAL NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, do Instituto Leônidas e Maria Deane, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva.

**Orientador: Prof. Dr. FELIPE ARLEY COSTA PESSOA**

**MANAUS – AM**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

G963a

Guimarães, Rebeca Cristina de Souza

Aspectos ecológicos e detecção de Leishmania em flebotomíneos de um assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil. / Rebeca Cristina de Souza Guimarães. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

74 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Profº. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa.

1. Leishmaniose    2. Flebotomíneos    3. Mudanças ambientais –  
Amazonas I. Título

CDU 616.993.161(811.3) (043.3)

CDD 616.9364098113

22. ed.

REBECA CRISTINA DE SOUZA GUIMARÃES

ASPECTOS ECOLÓGICOS E DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* EM  
FLEBOTOMÍNEOS DE UM ASSENTAMENTO RURAL NO ESTADO DO  
AMAZONAS, BRASIL

Aprovada em: 11/09/2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, do Instituto Leônidas e Maria Deane, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Felipe Arley Costa Pessoa - Orientador  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dr.<sup>a</sup> Alessandra Ferreira Dales Nava – Membro  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dr. Jansen Fernandes de Medeiros – Membro  
Fiocruz Rondônia

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Felipe Arley Costa Pessoa, pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade, e pela oportunidade descobrir um novo e interessante mundo, a entomologia.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Leônidas e Maria Deane e ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia – PPGVIDA.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, que me auxiliou durante todos os momentos do mestrado.

Ao Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, à Dra. Célia Gontijo e à toda equipe do Grupo de Estudos em Leishmaniose pela acolhida e por terem me ajudado com os métodos moleculares.

Ao MSc Eric Marialva, pelo apoio e paciência, ao me ensinar a montar e identificar os flebotomíneos

Aos MSc Jordan William e Jéssica Feijó, pela ajuda com as análises estatísticas e mapas

À Dra. Cláudia Rios, pela ótima companhia durante a viagem à Belo Horizonte, pela ajuda com os métodos moleculares e por todas as vezes que reservou um raro tempinho para esclarecer minhas dúvidas

À todos os colegas do Laboratório de Entomologia do ILMD, em especial as meninas, Heliana Belchior, Kelly Regina, Raissa Moura e Dra. Keillen Monick, por todo cainho, amizade e humor, que fizeram do meu trabalho muito mais divertido e produtivo.

À todos os funcionários do ILMD, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

À FAPEAM e ILMD, pelo financiamento na Chamada Pública N° 001/2014 PROEP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Rosa Alves  
por todo o amor e apoio incondicional  
nessa jornada.

## RESUMO

As mudanças ambientais causadas pelo desmatamento e urbanização desordenada têm promovido alterações no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar (LT). Estudos realizados nas últimas décadas têm demonstrado a presença frequente de algumas espécies vetoras de flebotomíneos em ambiente peridomiciliado, por isso, a identificação de destes vetores e detecção de agentes etiológicos nos mesmos são importantes para o desenvolvimento de medidas de controle, e de vigilância epidemiológica. Este trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos ecológicos de flebotomíneos e verificar a taxa de infecção natural por *Leishmania* nos mesmos, em um assentamento rural no Amazonas. As coletas foram realizadas no assentamento rural de Rio Pardo, no município de Presidente Figueiredo, durante 05 dias consecutivos nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016, em modelo de estratificação vertical e horizontal, com o uso de armadilhas luminosas HP. Os flebotomíneos, em todo ou em parte dos corpos, foram montados em lâmina e identificados. *Pools* de parte das fêmeas coletadas foram agrupadas em pools e foi realizada PCR convencional e PCR-RFLP da região ITS1 para detecção de DNA de *Leishmania*. Um total de 3.186 flebotomíneos foram identificados, compreendendo 1.751 (54%) de fêmeas e 1.435 (46%) de machos distribuídos em 13 gêneros e 52 espécies. O gênero mais abundante foi *Nyssomyia*, com seis espécies e 1.390 indivíduos. A espécie mais abundante foi *Ny. umbratilis* capturada com frequência em todos os ambientes. Foi observado diferença significativa na diversidade, entre os ambientes de solo e dossel ( $p=0.00017$ ), e entre floresta, borda e peridomicílio ( $p=0,0026$ ). A equitabilidade foi maior no ambiente de borda ( $J'=0,87$ ) em relação aos demais ambientes. O índice de dominância foi maior no peridomicílio ( $C'=0,37$ ), sendo *Ny. antunesi* a espécie mais abundante. Os ambientes de borda e floresta foram os mais similares ( $C_j'=83\%$ ). Foi detectado DNA de *Leishmania* em cinco espécies de flebotomíneos. A taxa de infecção mínima foi de 1,15%. Foi registrado a primeira infecção por *Trypanosoma* sp. na espécie *Sc. nematoducta* e o primeiro registro de *Ps. amazonensis* e *Lu. gomezi* infectados por *L. naiffi*. Os resultados deste trabalho demonstram que algumas espécies de flebotomíneos presentes em ambientes silvestres estão se adaptando a ambientes mais antropizados, o que pode potencializar o contato destes insetos com novas fontes hematofágicas e com o ser humano, assim, podendo aumentar o risco de transmissão de LT na localidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vetores, Saúde Pública, Mudanças ambientais, Amazonas

## ABSTRACT

Environmental changes caused by deforestation and disordered urbanization are affecting the tegumentary leishmaniasis (TL) transmission cycle. Studies conducted in the last decades shown the frequent presence of some species of sandflies vectors in the peridomestic environment. Therefore, the identification of these vectors and detection of etiological agents in them are important for the development of control measures and epidemiological surveillance. This study aimed to evaluate the ecological aspects and to verify the rate of natural infection by *Leishmania* at the sand flies in a rural settlement in the Amazon state. Samples were collected in the rural settlement of Rio Pardo, in the municipality of Presidente Figueiredo, for five consecutive days, in the months of June, July, November and December 2016, in model of vertical and horizontal stratification, using HP light traps. The sand flies were mounted on glass slides and identified. The females were grouped into pools and conventional PCR and PCR-RFLP of the ITS1 region were performed to detect *Leishmania* DNA. A total of 3,186 sandflies were identified, comprising 1,751 (54%) females and 1,435 (46%) males distributed in 13 genera and 52 species. The most abundant genus was *Nyssomyia*, with six species and 1,390 individuals. The most abundant species was *Ny. umbratilis* captured frequently in all environments. Statistical difference was observed in diversity between soil and canopy environments ( $p = 0.00017$ ), and between forest, border and peridomicile ( $p = 0.0026$ ). The evenness was higher in the border environment ( $J' = 0.86$ ) compared to other. The dominance index was higher in the peridomestic environment ( $C' = 0.18$ ), where *Ny. antunesi* was the most abundant species. The border and forest environments were the most similar ( $C_j' = 83\%$ ). *Leishmania* DNA was detected in five species of sand flies. The minimum infection rate was 1.15%. The first *Trypanossoma* sp. infection was recorded in the species *Sc. nematoducta* and the first infection by *L. naiffi* was recorded in the *Ps. amazonensis* and *Lu. gomezi* sand flies. The results of this work demonstrate that some species of sand flies present in wild environments are adapting to more anthropized environments, which may enhance the contact of these insects with new blood source and human, thus increasing the risk of TL transmission in the locality.

**KEY WORDS:** Vectors, Public Health, Environmental Changes, Amazon



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução:</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 O Impacto das Mudanças Ambientais nos Ciclos Naturais de Doenças Transmitidas por Vetores Artrópodes:</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Leishmanioses:</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 Leishmania:</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Ciclo de Transmissão da Leishmania:</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Flebotomíneos:</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6 Infecção Natural em Hospedeiros Silvestres e Flebotomíneos:</b> .....	<b>21</b>
<b>1.7 Métodos Diagnósticos Para Detecção De Leishmania em Flebotomíneos:</b> .....	<b>22</b>
<b>1.8 Os Efeito da Antropização na Transmissão da Leishmaniose Tegumentar:</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Justificativa:</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Objetivos:</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Geral:</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Específicos:</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Material e Método:</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Local do Estudo:</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Coleta de Flebotomíneos:</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2 Montagem de Lâminas e Identificação de Flebotomíneos:</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Extração de DNA:</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 PCR Para Detecção de Leishmania sp.:</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5 PCR-RFLP Para Identificação de Espécies de Leishmania:</b> .....	<b>36</b>
<b>4.6 Análises Estatísticas:</b> .....	<b>37</b>
<b>5. Resultados:</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1 Distribuição Geral de Flebotomíneos:</b> .....	<b>39</b>
<b>5.2 Estratificação Vertical de Flebotomíneos – Dossel e Solo:</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3 Estratificação Horizontal de Flebotomíneos – Floresta, Borda de floresta e Peridomicílio:</b> .....	<b>43</b>
<b>5.4 Abundância e Diversidade de Espécies Vektoras:</b> .....	<b>47</b>
<b>5.5 Detecção e Identificação de <i>Leishmania sp.</i> em Flebotomíneos:</b> .....	<b>49</b>
<b>6. DISCUSSÃO:</b> .....	<b>54</b>
<b>6.1 Abundância e Diversidade Geral de Flebotomíneos:</b> .....	<b>54</b>
<b>6.2 Aspectos Ecológicos de Flebotomíneos em Estratificação Vertical:</b> .....	<b>55</b>
<b>6.3 Aspectos Ecológicos de Flebotomíneos em Estratificação Horizontal:</b> .....	<b>56</b>
<b>6.4 Abundância e Diversidade de Espécies Vektoras:</b> .....	<b>58</b>
<b>6.5 Infecção Natural por Leishmania em Flebotomíneos:</b> .....	<b>60</b>

<b>7. Conclusão:</b> .....	<b>61</b>
<b>8. Referências Bibliográficas:</b> .....	<b>63</b>

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do flebotomíneo.....	18
<b>Figura 3.</b> Flebotomíneos ( <i>Psychodopygus</i> sp.).....	19
<b>Figura 4.</b> Ciclo de transmissão da <i>L. guyanensis</i> .....	22
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de atividades para o desenvolvimento do projeto.....	27
<b>Figura 6.</b> Visualização Espacial de Rio Pardo.....	28
<b>Figura 7.</b> Imagens do assentamento rural Rio Pardo.....	29
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica do esquema de coleta de flebotomíneos, em estratificação vertical e estratificação horizontal, no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, 2016.....	31
<b>Figura 9:</b> Captura de flebotomíneos em estratificação vertical, plataforma Maria Gusmão.....	32
<b>Figura 10:</b> Captura de flebotomíneos em estratificação horizontal.....	33
<b>Figura 11.</b> Estruturas taxonômicas utilizadas para identificação das espécies de flebotomíneos.....	34
<b>Figura 12.</b> Perfil de diversidade de Rényi de flebotomíneos coletados nos ambientes de Solo e Dossel no assentamento rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, 2016.....	42
<b>Figura 13.</b> Curvas de rarefação representando a riqueza acumulativa de espécies de flebotomíneos coletados por armadilhas HP nos ambientes de dossel e solo no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro 2016.....	43
<b>Figura 14.</b> Perfil de diversidade de Rényi das coletas de flebotomíneos por armadilhas HP nos ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio, do assentamento rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.....	44
<b>Figura 15.</b> Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) para os ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio do assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas em 2016.....	45
<b>Figura 16.</b> Curvas de rarefação representando a riqueza acumulativa de espécies de flebotomíneos nos ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016. ....	47
<b>Figura 17.</b> Gel de agarose à 2%, corado com brometo de Etídio, mostrando produtos amplificados pela PCR ITS1.....	50
<b>Figura 18.</b> Resultados da PCR-RFLP mostrando fragmentos amplificados para região ITS1.....	52
<b>Figura 19.</b> Mapa do assentamento rural de Rio Pardo (D) demonstrando os pontos de coleta onde foram capturados os flebotomíneos naturalmente infectados.....	53

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1:** Espécies de flebotomíneos capturados por armadilhas HP em modelo de estratificação vertical (Solo e Dossel) e estratificação Horizontal (Floresta, Borda de floresta e Peridomicílio) no Assentamento Rural Rio Pardo, em Presidente Figueiredo - AM, no período de junho e julho, agosto e setembro de 2016 ..... **40**
- Tabela 2.** Valor de indicação de espécies (IndVal) de flebotomíneos coletados por armadilhas HP nos ambientes de floresta, borda e peridomicílio no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo - AM, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016..... **46**
- Tabela 3.** Espécies de flebotomíneos, vetores e putativos, capturados por armadilha HP em diferentes ambientes no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo – AM, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016..... **48**
- Tabela 4.** Distribuição do número de pools de flebotomíneos analisados, por espécie e ambiente, do assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Amazonas, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016..... **49**
- Tabela 5.** Distribuição dos pools positivos para infecção por *Leishmania* sp. utilizando o alvo ITS1, e taxa mínima de infecção em flebotomíneos coletados no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo – AM no período de junho, junho, agosto e setembro de 2016..... **51**
- Tabela 6.** Resultado do sequenciamento das amostras positivas para região intergênica (ITS1) de flebotomíneos coletados com armadilhas HP nos meses de junho, julho, novembro e dezembro no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, 2016..... **50**

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1 O Impacto das Mudanças Ambientais nos Ciclos Naturais de Doenças Transmitidas por Vetores Artrópodes:

As doenças transmitidas por vetores artrópodes são de grande relevância para a saúde pública global, sendo responsáveis por causar enormes prejuízos socioeconômicos e diversas mortes anualmente (HARRUS e BENETH, 2005). Essas doenças são consideradas negligenciadas, e acometem principalmente pessoas em situação de risco, que vivem em regiões de intensa pobreza, como periferias e zonas rurais dos países de baixa renda, onde os serviços e políticas de saúde são insuficientes (MORAN, 2005; HOTEZ et al., 2006). Uma gama de agentes infecciosos, hospedeiros e vetores estão envolvidos na transmissão de doenças que afetam os seres humanos, como a malária, doença de Chagas, leishmanioses e algumas arboviroses, que possuem um caráter primariamente zoonótico, mantendo um ciclo de transmissão silvestre entre animais e vetores selváticos e assim, formando um complexo patógeno-hospedeiro-vetor que pode ser afetado por mudanças ambientais (VORA, 2008).

Tais mudanças incluem, o desmatamento e consequentes mudanças no uso da terra, como urbanização, a agricultura, atividades extrativistas, construção de estradas e sistemas de controle de água (barragens, canais, irrigação sistemas, reservatórios) e assentamentos rurais (WALSH et al., 2000). Associados as mudanças climáticas, como sazonalidade, aumento da temperatura, precipitação pluviométrica, entre outros, essas mudanças afetam a biologia de vetores e patógenos, sua dispersão, adaptação a novos ambientes e hospedeiros e, portanto, mudanças no ciclo de transmissão de doenças (CABLE et al., 2017; KILLPATRICK e RANDOLPH, 2012).

O desmatamento é uma das mudanças que mais afetam as populações de vetores e hospedeiros. As áreas desmatadas sofrem maior radiação solar em comparação com florestas primárias e secundárias, e apresentam características que afetam o comportamento e a distribuição de vetores, podendo também aumentar sua taxa de sobrevivência e o desenvolvimento de parasitos. PESSOA et al., (2007) realizaram estudo de fauna de flebotomíneos antes e depois do corte seletivo de madeira, em uma floresta amazônica, e observaram uma redução significativa da abundância de espécimes logo após o corte, contudo as taxas de infecção por *Leishmania* spp. mantiveram-se altas.

Nos períodos de maior pluviosidade, o solo desgastado acumula grandes quantidades de água na superfície, formando sítios de reprodução para diversas espécies de vetores. No oeste da África, o desmatamento para instalação de projetos extrativistas e de agricultura, causaram o aumento de sítios de água parada, que associados com a exposição à luz solar contribuíram para a reprodução de algumas espécies de *Anopheles*, que resultou no aumento da transmissão de malária nessa região (YASUOKA & LEVINS, 2007).

As florestas tropicais são responsáveis por manter uma grande diversidade de fauna e flora. Quando desmatadas, uma parte dessas florestas são tipicamente

convertidas em áreas para projetos agrícolas e assentamentos humanos, causando desequilíbrio ecológico, perda da diversidade e dominância de espécies, que se adaptam ao ambiente modificado. Outros fatores como a imigração de pessoas para áreas endêmicas e fragmentadas, a introdução de animais domésticos ou para consumo, como gado, porcos, galinhas, cães, entre outros, e a produção de lixo orgânico e inorgânico podem atrair animais silvestres e vetores ao peridomicílio (BARRET e SENRA, 1989; GUERRA et al., 2006).

O crescimento populacional nas cidades também impulsiona o desmatamento e a expansão de territórios em áreas periurbanas resultando na deterioração da oferta de serviços de saúde pública, saneamento, água, esgoto e resíduos, tornando mais fácil o contato com vetores e agentes infecciosos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças (CAMPBELL-LEDRUM et al., 2015; REIS et al., 2013).

## 1.2 Leishmanioses:

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por insetos flebótomos. São caracterizadas primariamente como zoonoses e integram o grupo de doenças infecciosas e negligenciadas de maior impacto na saúde pública mundial. De acordo com a análise global da carga de doenças infecciosas, a leishmaniose em suas diferentes formas clínicas é responsável por 2,35 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs).

Estas doenças possuem uma ampla distribuição geográfica e diversidade epidemiológica. Sua incidência é influenciada principalmente por fatores ambientais e socioeconômicos. Elas ocorrem principalmente em regiões tropicais da África, Ásia e Américas. As populações em situação de vulnerabilidade e com dificuldade no acesso aos serviços de saúde são as mais afetadas. Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e estejam expostas ao risco de infecção pelo patógeno (WHO, 2017; HOTEZ et al., 2006).

A Leishmaniose possui três formas clínicas principais: leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, e acomete órgãos vitais como baço e fígado, e cuja letalidade pode alcançar altas taxas quando não se institui o tratamento adequado; a leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum e disseminada da doença, a mucocutânea (LM), caracterizada por causar desfiguração facial e cicatrizes em outras partes do corpo e mucosas, e a leishmaniose tegumentar difusa (LTD), uma forma mais rara da doença que acomete principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LT é uma doença infecciosa, não contagiosa, que caracteriza-se como ulcerações no tecido cutâneo que podem assumir aspectos morfológicos diversos. A doença constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. A Organização Mundial da Saúde, considerada a LT como uma das

seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades (WHO, 2017).

Nas Américas a epidemiologia da doença é complexa, com variações nos ciclos de transmissão, hospedeiros, vetores e múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica (MAZORCHI e MAZORCHI, 1999). Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS, 2019), do total de casos de 2018, 72,6% foram reportados pelo Brasil (17.526), Colômbia (7.764), Peru (6.631) e Nicarágua (4.343).

No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras. Em 2017 foram registrados 17.528 novos casos de LT no país, e as regiões Norte e Nordeste apresentam os maiores números de casos da doença (BRASIL, 2017). A LT ocorre principalmente em áreas rurais e periféricas próximas ao ambiente florestal. As pessoas mais acometidas são, geralmente, homens na faixa etária dos 20-50 anos, que trabalham com atividades extrativistas ou rurais, como roçado, caça, retirada de madeira e minerais, pesca etc., incluindo também pessoas que adentram o ambiente florestal, em áreas endêmicas, para atividades de lazer, como acampar ou caminhadas em trilhas (BRASIL, 2017).

No estado do Amazonas, a LT é uma doença endêmica e apresenta altos índices de ocorrência. O principal agente etiológico no estado é *L. guyanensis*, transmitido pelo vetor 80 casos de LT no estado, a maior parte oriunda de Manaus, seguido dos municípios de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva. A doença ocorre principalmente na forma de surtos epidêmicos nos assentamentos populacionais recentes, próximos à floresta ou expostos diretamente em ambientes de mata primária, passando posteriormente a apresentar-se como endemia de casos esporádicos (BARRET e SENRA, 1994; GUERRA et al., 2003; GUERRA et al., 2007).

### 1.3 *Leishmania*:

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra sem flagelo ou amastigota, observada parasitando macrófagos nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. A reprodução desse protozoário ocorre por divisão binária simples em ambos os hospedeiros (LAINSON, 2010). Segundo a classificação proposta por LAINSON e SHAW (1987), o gênero *Leishmania* era dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. No entanto, recentemente, após uma revisão taxonômica, foi criado um novo subgênero, *Mundinia*, que comporta as espécies *L. enriettii* e *L. martiniquensis*, porém, apenas os dois primeiros subgêneros apresentam espécies capazes de infectar o homem e produzir doença (ESPINOSA et al., 2018).

Na região Norte do Brasil circulam oito espécies desses protozoários capazes de infectar o ser humano: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.*

(*V. guyanensis*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. No Estado do Amazonas já foram registradas as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni* (ARIAS & FREITAS 1978; LAINSON et al., 1994; SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA et al., 2004; GUERRA et al., 2006; PEREIRA-JUNIOR et al, 2017). O agente causador prevalente nos casos de leishmaniose no Amazonas é a espécie *L. guyanensis* (GUERRA et al., 2006; FEITOSA e CASTELLÓN, 2006).

#### 1.4 Ciclo de Transmissão da Leishmania:

O ciclo de transmissão (Figura 1A) começa quando uma fêmea de flebotomíneo infectada pica um hospedeiro humano ou outro mamífero para realização do repasto sanguíneo. Durante a picada, o inseto injeta saliva, impedindo a coagulação do sangue (RIBEIRO et al., 1986).

Após a ingestão de sangue, promastigotas metacíclicos são liberados e entram na pele do hospedeiro via regurgitação. Após a picada, são liberadas substâncias que induzem o rápido recrutamento de células, como os neutrófilos e, principalmente, macrófagos, para o local da lesão. N, neste momento, os parasitos presentes no local ligam-se à superfície da célula hospedeira através do flagelo ou do corpo celular e de diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos (PETERS et al., 2008; HANDMAN et al., 2002).

O processo de internalização via fagocitose começa com a formação de pseudópodes. Assim, após ligar-se à superfície do macrófago, o parasito é então internalizado no vacúolo parasitóforo; em seguida o promastigota metacíclico se transforma em amastigota e se prolifera, bipartindo-se diversas vezes (HANDMAN et al., 2002; STUART et al., 2008). Após uma intensa multiplicação, a membrana dos macrófagos se rompe, liberando assim os amastigotas no tecido; esses amastigotas invadem outros macrófagos ou ser ingeridos por um novo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (TEIXEIRA et al., 2013).

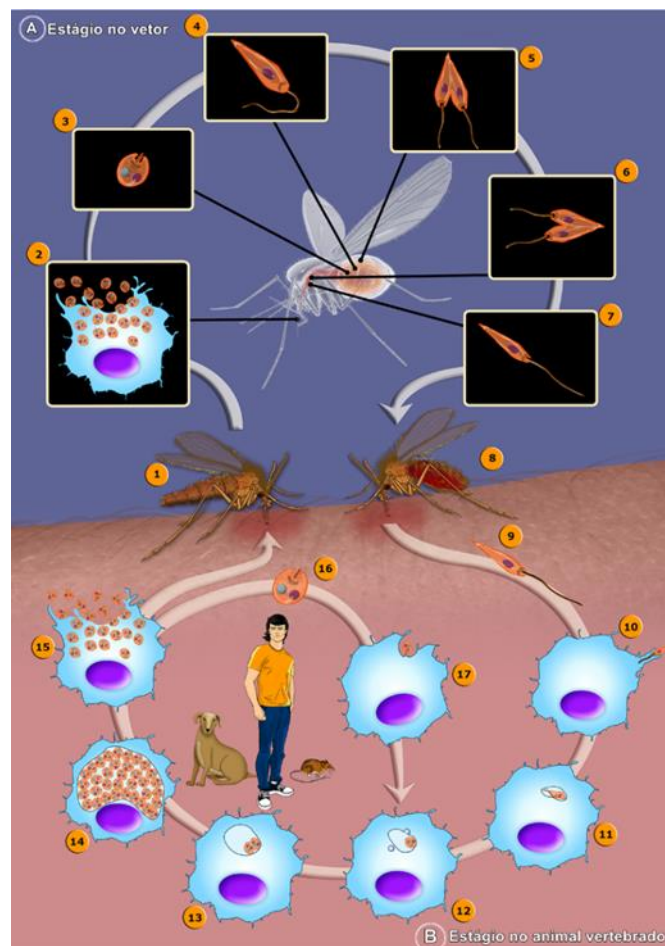
A infecção no hospedeiro invertebrado (Figura 3B) começa quando uma fêmea de flebotomíneo pica um mamífero infectado durante seu repasto sanguíneo. A fêmea usa suas peças bucais para perfurar a pele, cortando os capilares e formando uma poça de sangue de onde serão ingeridos os macrófagos infectados com amastigotas (RIBEIRO, 1995).

O sangue é digerido no intestino abdominal do inseto. Nesse novo ambiente, os amastigotas são agrupados formando aglomerados, e são envoltos pela matriz peritrófica (MP) que envolve o sangue ingurgitado e o protege de enzimas digestivas (SECUNDINO et al., 2005). Os amastigotas então se transformam em uma forma replicativa chamada promastigota procíclica. Durante a transformação, formas intermediárias entre amastigotas e promastigotas são mais suscetíveis à morte por enzimas digestivas encontradas no ambiente intestinal (PIMENTA et al, 1997).



Posteriormente, a porção anterior da MP se desfaz e os parasitos são liberados no epitélio intestinal do inseto. Os promastigotas se dividem por fissão binária e se aderem às microvilosidades do epitélio do intestino médio (PIMENTA et al., 1992). Quando os parasitos se desprendem do epitélio, os promastigotas migram em direção à válvula estomodeal localizada no intestino anterior, onde se concentram e reiniciam a divisão celular. Eles são responsáveis pela produção e secreção de um gel (PSG) que atua como um tampão que obstrui o intestino médio e a faringe (GOSSAGE et al., 2003). Durante a produção do PSG, os parasitos começam a se transformar em formas promastigotas metacíclicas. Esse processo de diferenciação é chamado de metaciclogênese (ROGERS, 2012).

Os parasitos causam danos à válvula estomodeal, interferindo em sua função e facilitando o refluxo dos parasitos do intestino médio torácico. Consequentemente, durante a realização de um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são liberadas e podem assim infectar um novo hospedeiro mamífero, reiniciando o ciclo (TEIXERA et al., 2013).

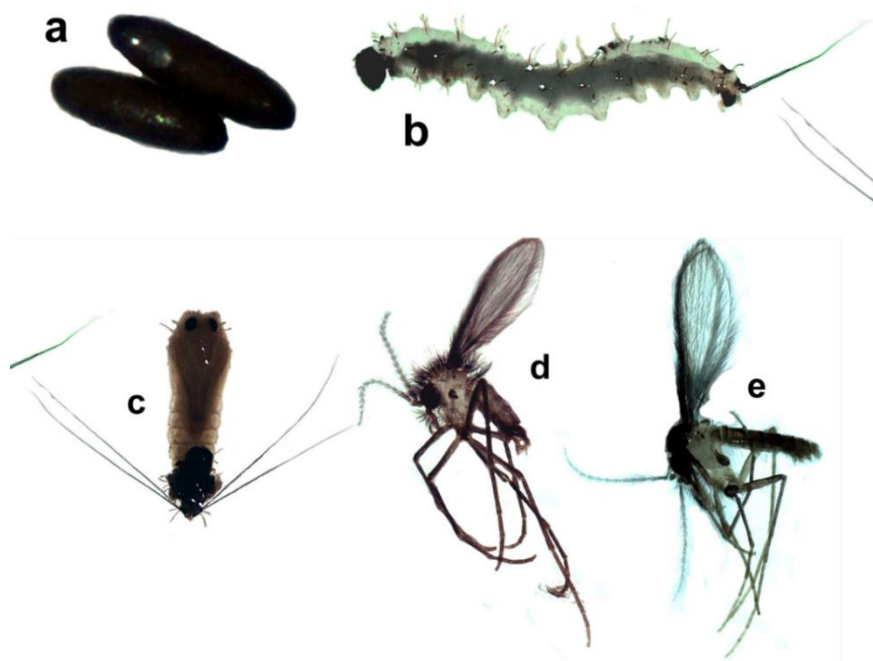


**Figura 1.** Ciclo de vida da *Leishmania*. A - Ciclo no vetor. B - Ciclo no hospedeiro vertebrado. Adaptado de Teixeira et al., 2013.

## 1.5 Flebotomíneos:

Os flebotomíneos são insetos pertencentes a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae; esses insetos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes exceto nas regiões polares (LEWIS, 1974). No Brasil são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui etc (BRASIL, 2017).

Os flebotomíneos são holometábolos (Figura 2). As fases imaturas ocorrem em ambiente terrestre, em locais úmidos e com matéria orgânica disponível para o seu desenvolvimento. Os ovos são elípticos, as larvas são eucéfalas e vermiformes, com pseudópodes que permitem a sua locomoção no substrato e longas cerdas. As pupas são claviformes caudais (LEWIS, 1974; KILLICK-KENDRICK, 1999).



**Figura 2.** Ciclo de vida do flebotomíneo: A. Ovo, B. Fases larvais: 1 a 4, C. Pupa, D. Inseto adulto. Fonte: Acervo EDTA

Os adultos de flebotomíneos são pequenos, tendo em média de 2 a 5 mm de comprimento, a coloração varia de amarelo claro a marrom escuro, com pernas longas e o corpo delgado e hirsutos (Figura 2). A extremidade posterior do abdome é bem diferenciada; nos machos os últimos seguimentos são modificados a partir do 9º tergito e esternito que constituem é bifurcada, com genitália externa, e nas fêmeas é pontuda ou ligeiramente arredondada com a genitália interiorizada (GALATI, 2018).

O tamanho da probóscide também é diferenciado, sendo menor nos machos e maiores nas fêmeas que possuem longas probóscides adaptadas para perfuração e sucção e apresentam no seu interior um conjunto de estruturas quitinizadas chamadas de cibário, que também estão associadas à hematofagia. O vôo desses insetos caracteriza-se por ser curto de modo, saltatórios. (LEWIS, 1974; KILLICK-KENDRICK, 1999).



**Figura 3.** Flebotomíneos (*Psychodopygus* sp.). Assentamento Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, 2016.  
Fonte: Acervo EDTA.

Os flebotomíneos possuem hábitos noturnos e crepusculares, com algumas espécies ativas durante o dia (ARIAS e FREITAS, 1982). São encontrados em dosséis e troncos de árvores, cavernas, tocas de animais, locais úmidos e em peridomicílios (LEWIS, 1974; BRAZIL & BRAZIL, 2018). Esses insetos alimentam-se de fontes ricas em açúcar, como seiva de plantas e secreções produzidas pelos afídeos. Apenas as fêmeas são hematófagas, alimentando-se de uma variedade de animais silvestres, domésticos e as vezes seres humanos e a. A preferência pelo tipo de fonte de repasto hospedeiro para a obtenção do sangue também varia entre as diversas espécies de flebotomíneos (LEWIS, 1974; CAMERON et al., 1995; BRAZIL & BRAZIL, 2018).

Para sua identificação, os flebotomíneos passam pelo processo de clarificação e diafanização, através do qual as estruturas morfológicas se tornam translúcidas possibilitando a visualização das estruturas internas, como a espermateca e o cibário das fêmeas, e as estruturas genitais dos machos. Após estes procedimentos, os espécimes são montados em lâmina utilizando diferentes meios, como Berlese, para montagens temporárias, e Bálsamo do Canadá, para montagens permanentes (SANTOS, 2014).

Para os flebotomíneos do Novo Mundo são utilizadas duas classificações, a de Young and Duncan (1994) similar a proposta por Lewis (1977) e a proposta por Galati (1995, 2003) através da utilização de um método cladístico, a qual apresenta maior amplitude metodológica e maior número de espécies classificadas, sendo atualmente a mais utilizada.

Existem aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, e 10% estão envolvidas na transmissão de doenças para humanos e outros mamíferos (MAROLI et al., 2013). Dessa proporção, 60% das espécies são catalogadas na região neotropical. No Brasil, 279 espécies foram possuem ocorrência até o momento respondendo por 31% de todas as espécies conhecidas no mundo. A região Norte do Brasil possui 204 espécies, das quais 64 são endêmicas. Nessa região, o Estado do Amazonas detém o maior número de espécies, com 141 descritas até o momento (AGUIAR & VIEIRA, 2018).

Os flebotomíneos são vetores de agentes etiológicos de diversas doenças pelo mundo, e possuem notória importância, sendo reconhecidos como principais transmissores de parasitos do gênero *Leishmania*. Também estão envolvidos na transmissão de outros patógenos como a bactéria *Bartonella bacilliformes*, causadora da bartonelose, que é uma bacteriose fatal em muitos casos, e de alguns vírus, denominados *Phlebovirus*, e de tripanossomatídeos (LEWIS, 1974; FRANCO & GRIMALDI et al., 1991; MAROLI et al., 2013; MORICONI et al., 2017).

No Brasil, os flebotomíneos obtiveram destaque pela primeira vez, quando ARAGÃO (1922) demonstrou o papel destes insetos na transmissão da LT no Rio de Janeiro. Desde então, centenas de artigos sobre ecologia, incriminação vetorial e outros temas foram publicados no país. Atualmente as espécies de flebotomíneos responsáveis pela disseminação de *Leishmania* spp. pertencem aos seguintes gêneros no Brasil são: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* (COSTA & SOUZA, 2018).

O Estado do Amazonas apresenta uma grande diversidade de flebotomíneos. Estudos apontam que as espécies *Ny. anduzei*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Ny. yuilli yuilli*, *Py. amazonensis*, *Py. ayrozai*, *Ps. chagasi*, *Ps. davisi* e *Th. ubiquitalis* têm sido as mais abundantes no estado (ARIAS e FREITAS 1978; BARRETT et al. 1996; CASTTELÓN et al. 2000; DIAS-LIMA et al. 2002; ALVES et al. 2012; RAMOS et al., 2014; ROCHA et al. 2013, PEREIRA-JUNIOR, 2017; CHAGAS et. al, 2018).

## 1.6 Infecção Natural em Hospedeiros Silvestres e Flebotomíneos:

A LT no Brasil é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas e a maior diversidade desses parasitos é encontrada na região Amazônica (FONTES). A transmissão destes agentes envolve diferentes espécies de flebotomíneos em estreita relação com roedores, marsupiais, endentados entre outros animais, que servem de reservatórios dos parasitos (RANGEL et al., 2018). A interação hospedeiro-parasito-vetor é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial e pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente (WALSH et al., 1993).

Diversas espécies de mamíferos agem como hospedeiros naturais de *Leishmania*. e nestes, raramente o parasito produz doença. Além disso, muitas espécies de flebotomíneos preferem um só hospedeiro silvestre ou não são naturalmente atraídos pelo ser humano, assim, o ciclo de transmissão enzoótico de algumas espécies de *Leishmania* ocorre no topo das árvores, entre animais arborícolas e vetores ali presentes, enquanto em outras espécies do parasito o ciclo ocorre na base das árvores e no nível do chão entre roedores e marsupiais terrestres, canídeos etc., e vetores. Neste ciclo, geralmente, o ser humano entra como hospedeiro acidental, quando adentra o ambiente silvestre e conseqüentemente entra em contato com o vetor infectado em seu sítio natural, contraindo a infecção (RANGEL et al., 2018).

No Amazonas os mamíferos silvestres reconhecidos principalmente como reservatórios de LTA são: *Choloepus didactylus*; *Tamandua tetradactyla*; *Proechimys sp.* e *Didelphis marsupialis*, sendo este último um dos hospedeiros mais importantes, pois tem o hábito de transitar no peridomicílio humano, estabelecendo um elo entre os ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar. (ARIAS & NAIFF, 1981; LAINSON, 1983; LAINSON et al. 1984; GUERRA et al. 2006).

Um exemplo desta relação é a transmissão de *L. guyanensis* (Figura 4) que tem como principal vetor *Ny. umbratilis*, uma espécie que é extremamente abundante no dossel da floresta, mas desce ao solo, para repousar nas bases de árvores e também realizar a ovioposição (GUERRA et al., 2006; RANGEL et al., 2018). O ciclo enzoótico de transmissão ocorre em geral, no topo das árvores, à noite entre animais arborícolas, como a preguiça de dois dedos, *Choloepus didactylus*, e o tamanduá, *Tamandua tetradactyla*. Nesses casos o ser humano é geralmente infectado nas primeiras horas do dia, quando adentra o ambiente florestal onde os vetores encontram-se descansando nas bases de troncos de árvores altas (CABANILLAS e CASTELLÓN, 1999; RANGEL et al., 2018).



**Figura 4.** Ciclo de transmissão da *L. guyanensis*. Fonte: SVS, 2017.

### 1.7 Métodos Diagnósticos Para Detecção De Leishmania em Flebotomíneos:

O método clássico para detecção de infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* sp. é a dissecação de fêmeas recém capturadas e a visualização das formas flageladas após a retirada do tubo digestório das mesmas (ARIAS e FREITAS, 1978; FEITOSA e CASTELLÓN, 2004; PESSOA et al., 2007; SILVA et al., 2014 e PEREIRA-JUNIOR et al., 2015). Este método auxiliou a incriminar as principais espécies de vetores como *Bi. flaviscutellata*, *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Ny. withmani*, *Ny. intermedia* entre outras (LAINSON & SHAW, 1968; PESSÔA & COUTINHO, 1941; LAINSON et al., 1976; QUEIRÓZ et al. 1994).

As taxas de infecção por *Leishmania* sp., detectadas por dissecação de flebotomíneos em geral são baixas, e quando ocorrem infecções submicroscópicas a detecção passa despercebida ao microscópio, dando um viés negativo da infecção. Além do mais, após a observação microscópica das formas do parasito é necessária uma confirmação da infecção através do cultivo dos parasitos isolados ou da inoculação destes em cobaias laboratoriais (LAINSON 2010; MICHALSKY et al., 2002).

Atualmente técnicas de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) possibilitam a detecção e identificação de espécies através da amplificação de fragmentos de DNA.

Esta técnica, apesar de ter um custo mais elevado, tem maior sensibilidade e pode ser realizada com indivíduos armazenados em álcool e, sendo possível processar muitas amostras, o que otimiza o processo de diagnóstico de infecção (BARKER, 1987; NEITZKE et al., 2008).

O método de PCR tem sido bem empregado no diagnóstico laboratorial das espécies de *Leishmania* em seres humanos como mostram os trabalhos realizados por GUERRA et al., (2011) e COELHO et al., (2010). Em alguns poucos estudos com vetores na Amazônia têm demonstrado a eficiência do método na mensuração das taxas de infecção natural por *Leishmania* e indicaram presença de infecção em espécies não incriminadas anteriormente.... (GIL et al., 2003; PEREIRA-FILHO 2018; TELES et al., 2016; SILVA et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2015; CHAGAS et al., 2018).

## **1.8 Os Efeito da Antropização na Transmissão da Leishmaniose Tegumentar:**

Nas últimas décadas, análises epidemiológicas da têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da LT, inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas (MAZORCHI e MAZORCHI, 1994). Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas (PASSOS et al., 1993; PAES, 1991; CHAGAS et al., 2006; ALVES et al., 2012).

O desmatamento e posterior urbanização de áreas endêmicas foram acompanhados por aumentos nos casos de LT, e estudos tem demonstrado que algumas espécies de flebotomíneos respondem à invasão humana adaptando-se ao ambiente doméstico (LIMA et al., 1988; VILELA et al., 2011; BARATA et al., 2011). Segundo CAMPBELL-LENDRUM et al., (2001) a relação entre a transmissão e alterações do ecossistema induziu a alguns autores acreditarem que o desmatamento erradicaria a doença de algumas localidades, no entanto, tais previsões se mostraram errôneas.

Em áreas antropizadas, próximas a fragmentos florestais, a presença de abrigos de animais e resíduos orgânicos têm atraídos animais silvestres e insetos, como os flebotomíneos, ao peridomicílio, o que ocasionalmente pode alterar o ciclo de transmissão silvestre da doença e aumentar as chances de contato com vetores infectados (FEITOSA e CASTELLÓN, 2004; REIS et al., 2013). Estudos realizados no Amazonas, tem demonstrado que o marsupial conhecido popularmente como mucura (*Didelphis marsupialis*) tem se mostrado um competente reservatório natural de *Leishmania*, sendo encontrado com facilidade próximo ao peridomicílio de conjuntos habitacionais e assentamentos humanos (ARIAS e NAIFF, 1981; BARRET e SENRA, 1989; GUERRA et al., 2007).

Algumas espécies de flebotomíneos, como *Ny. antunesi*, são altamente sinantrópicas sendo capturada frequentemente em áreas desmatadas e próximas ao peridomicílio, associada principalmente a abrigos de animais (GIL et al., 2009;



RAMOS et al., 2014). Esta espécie tem sido apontada como vetor de LT no estado do Pará, que apresenta o maior número de casos da doença na região norte...

Em Manaus, desde a década de 1970, a consolidação da Zona Franca, resultou em fluxo migratório constante para a cidade de Manaus, com construção de moradias de forma desorganizada e ocupação dos arredores da cidade (GUERRA et al., 2015). Durante a década de 1980, o aumento populacional, o desmatamento e posterior urbanização de uma área endêmica para *L. (V.) guyanensis* fez com que dobrasse a incidência de casos de LT na cidade (BARRET e SENRA, 1989). Em um levantamento faunístico, PAES (1991) encontrou *Ny. umbratillis* em área peridomiciliar de um bairro recém implementado na cidade. Esse fato também foi observado por FEITOSA e CASTELLÓN (2004) em uma área residencial e endêmica de LT em Manaus. A ocorrência de casos de LT em crianças e idosos foi observada por ambos os autores, que destacaram a possibilidade de adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar.

Em outro estudo, realizado por SERAFIM et al. (2018) foi observado que ao realizar um segundo repasto sanguíneo, em fontes alimentares como aves, que são refratárias ao parasito, ou em animais que geralmente não são considerados habituais ao comportamento alimentar do flebotomíneos, tais fatores podem contribuir para o estabelecimento de um ciclo de transmissão.

Estudos mostraram, ainda, que além de serem capturadas em áreas urbanas, algumas espécies de flebotomíneos têm realizado repasto sanguíneo em humanos nessas áreas, o que pode aumentar as chances de infecção por leishmânias (NERY et al., 2004).



## **2. JUSTIFICATIVA:**

As mudanças ambientais causadas pelo desmatamento e urbanização desordenada promovem alterações profundas nos ciclos de transmissão de doenças transmitidas por vetores artrópodes como as leishmanioses, e estudos tem demonstrado que assentamentos humanos em áreas próximas as florestas propiciam ambientes que atraem flebotomíneos ao peridomicílio. A possível adaptação dos flebotomíneos a ambientes antropizados, e a novas fontes de repasto, como animais domésticos e até mesmo o ser humano é um fator que incrementa o risco de transmissão de LT.

De acordo com o Ministério da Saúde acerca da LT, o levantamento entomológico é um ponto de fundamental importância para conhecimento dos focos de transmissão da doença. Nesse contexto, a identificação de vetores e detecção de agentes etiológicos nos mesmos são fatores importantes cruciais, pois possibilitam o desenvolvimento de medidas de controle e vigilância epidemiológica.

Devido à aos dados apresentados anteriormente, justifica-se a realização de estudos para avaliar os efeitos da antropização na composição e distribuição da fauna de flebotomíneos em diferentes paisagens de um assentamento rural e verificar infecção natural nos respectivos insetos afim de identificar quais espécies de *Leishmania* estão ocorrendo no local.

### **3. OBJETIVOS:**

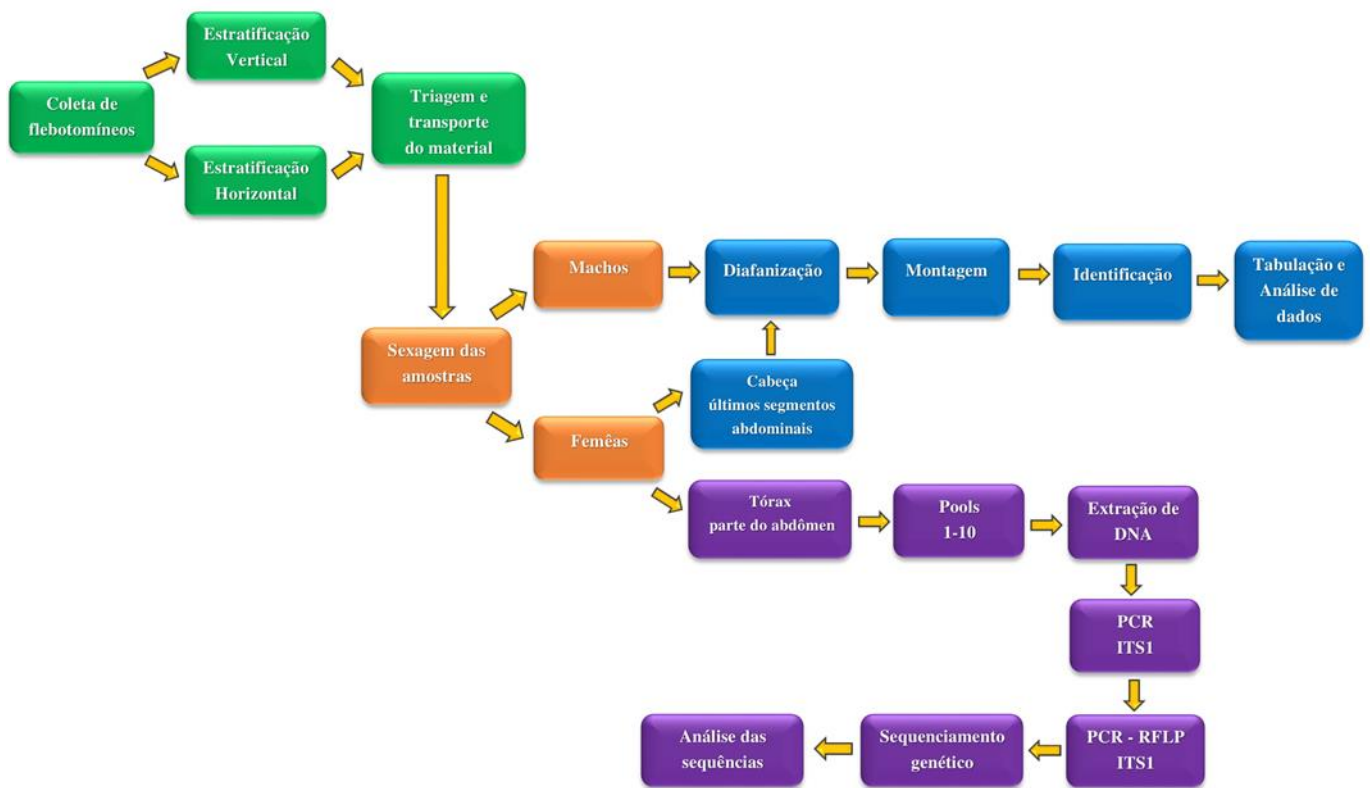
#### **3.1 Geral:**

Verificar possíveis mudanças nos aspectos ecológicos de flebotomíneos em diferentes paisagens de um assentamento rural no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil.

#### **3.2 Específicos:**

- Avaliar a composição faunística de flebotomíneos em diferentes níveis de estratificação, em ambientes silvestres e antropizados em um assentamento rural no Estado do Amazonas, Brasil.
- Verificar infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos em um assentamento rural no Estado do Amazonas, Brasil.
- Analisar o risco de transmissão de leishmaniose tegumentar em diferentes áreas em um assentamento rural no Estado do Amazonas, Brasil

#### 4. MATERIAL E MÉTODO:

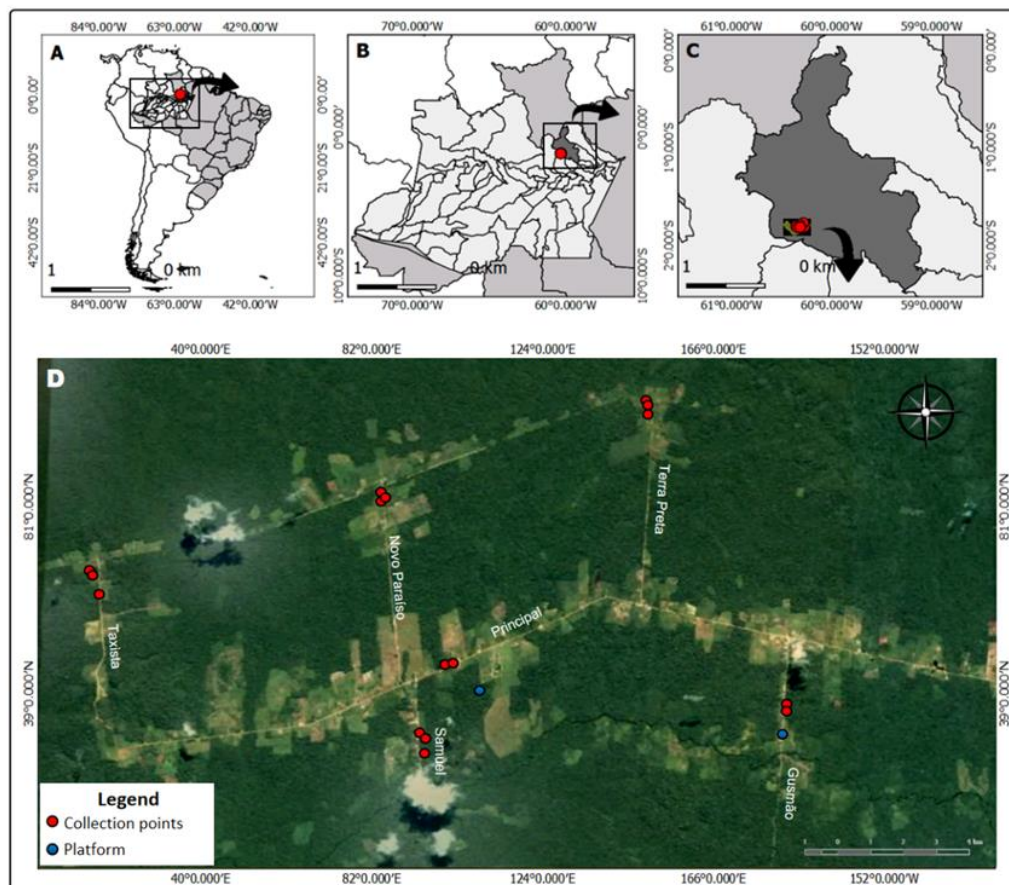


**Figura 5.** Fluxograma de atividades para o desenvolvimento do projeto.

#### 4.1 Local do Estudo:

O local escolhido para a realização do trabalho foi o assentamento rural Rio Pardo (S01°49'02.4" W060°19'03.6"), localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, a 110 km de Manaus. O acesso é feito por via terrestre pela rodovia BR-174, que liga o estado do Amazonas ao estado de Roraima e depois por mais 17 km em estrada de terra, com acesso pelo Assentamento Rio Canoas (Figura 6).

O assentamento agrícola, foi criado em 1996 pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), possui uma área de 27.980 hectares e possui seis ramais, denominados de Principal, Maria Gusmão, Samuel, Terra Preta, Taxista e Novo Paraíso. A principal atividade econômica local é a agricultura familiar. Alguns moradores também possuem gados para fins comerciais, no entanto, a maioria mantém animais domésticos de pequeno e médio porte, para consumo próprio como galinhas, porcos e mais recentemente a criação de peixes.



**Figura 6.** Visualização espacial de Rio Pardo: Mapa do Brasil (A), destacando o Estado do Amazonas (B), Município de Presidente Figueiredo, destacando o assentamento rural de Rio Pardo (C), Mapa do assentamento rural de Rio Pardo (D). Em azul os locais onde as duas plataformas foram construídas a aproximadamente 12 metros de altura. Em vermelho os pontos de coleta nos ramais do assentamento. Ramal

Principal, Ramal Gusmão, Ramal Terra Preta, Ramal Samuel, Ramal Novo Paraíso e Ramal Taxista.

Segundo um censo populacional, realizado em 2015 pelo laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis (EDTA), do instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD Fiocruz Amazônia), havia, até aquele momento, 584 moradores no assentamento. O clima local caracteriza-se como tropical úmido (tipo Af), conforme classificação de Koppen, com temperatura média anual de 27°C. Na localidade ocorrem dois períodos climáticos, um período chuvoso, de novembro a maio, e um período seco, de junho a outubro. Além do mais, a Fiocruz possui uma base de campo permanente de trabalho de campo, facilitando o desenvolvimento da pesquisa (Figura 7).



**Figura 7.** Imagens do assentamento rural Rio Pardo. A – Ambiente desmatado, B – Aspecto de uma moradia local, C- Base da Fiocruz no assentamento, D – Ramal Maria Gusmão. Fonte: Acervo EDTA.

#### 4.1 Coleta de Flebotomíneos:

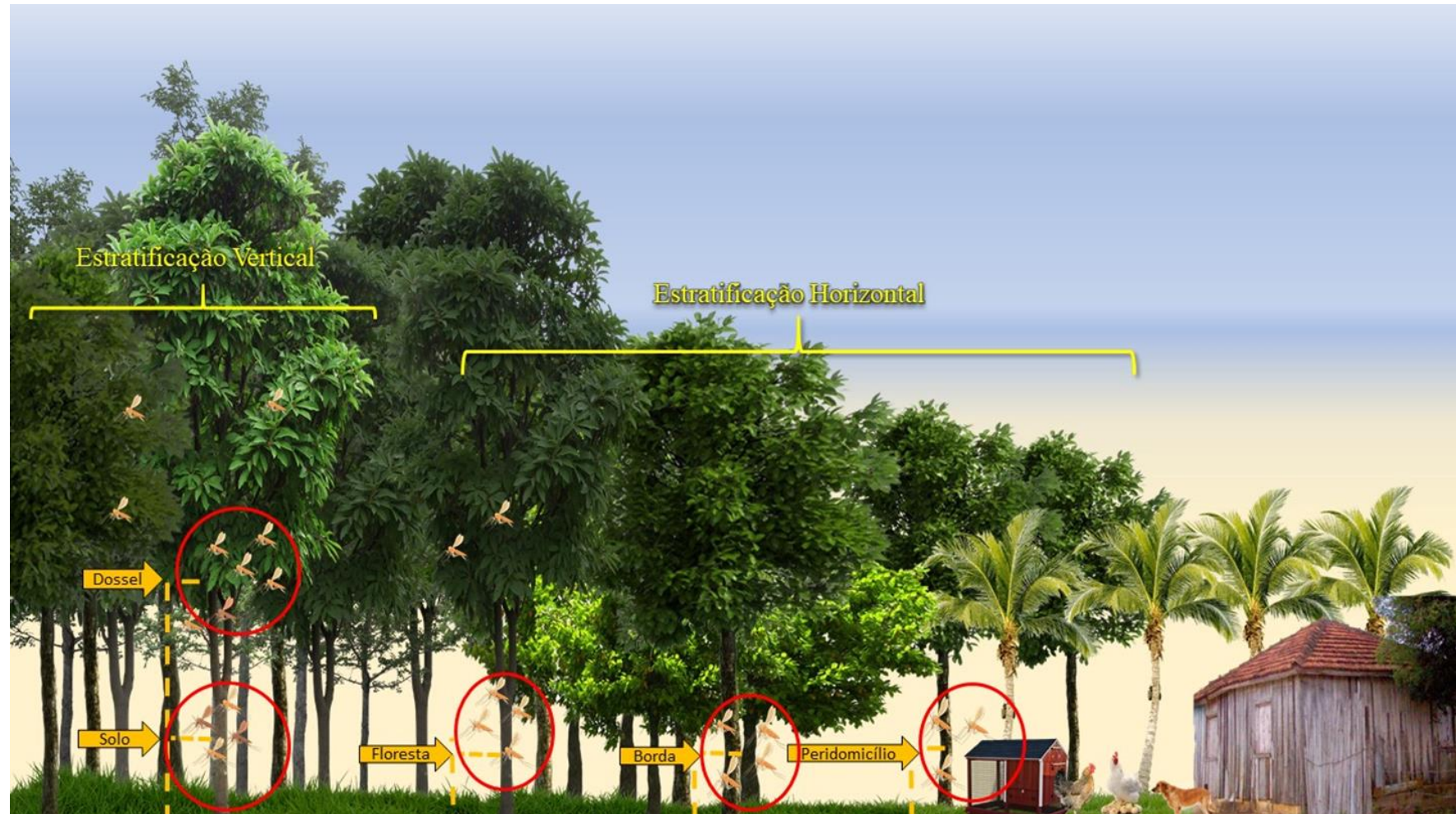
Para a coletas de flebotomíneos, foram realizadas quatro excursões para o assentamento rural durante os meses de junho, julho (período seco), novembro e dezembro (período chuvoso) de 2016. As coletas foram realizadas por cinco dias consecutivos, em transectos de estratificações horizontais e verticais (Figura 8).

Para a realização das coletas em transecto vertical, foram abertas trilhas em ambiente de floresta primária, em dois ramais do assentamento, uma no ramal Principal (S01°48'13.4" e W060°18'44.3") e uma no ramal Maria Gusmão (S01°49'02.3" W060°19'03.5") à mais ou menos 300 metros de distância da estrada que dá acesso ao local. Neste ambiente, foi escolhido uma árvore de aproximadamente 15m de altura, copa alta, onde foi construída uma plataforma de acesso próximo ao dossel, para a instalação das armadilhas luminosas do tipo HP (Figura 9). Também foram instaladas armadilhas na base do tronco das árvores, à aproximadamente 2 m do solo. As coletas foram realizadas no período das 18:00 h às 06:00 h.

Para a realização das coletas de estratificação horizontal foram escolhidas duas residências em cada um dos seis ramais do assentamento rural, ramal Taxista, ramal Maria Gusmão e ramal Samuel, ramal Principal, ramal Novo Paraíso e ramal Terra Preta. Os locais escolhidos foram separados por uma distância superior a 300 metros, cada um contendo os ambientes de peridomicílio, borda de floresta e floresta (Figura 10). Em cada ambiente foram instaladas, simultaneamente, uma armadilha luminosa HP, por cada noite, no período das 18:00 h às 06:00 h.

Diariamente, as armadilhas foram retiradas e os insetos coletados eram transportados vivos até o laboratório de campo, presente no assentamento, onde os flebotomíneos foram triados com o auxílio de aspirador tipo Castro (manual) e colocados em tubos com álcool 96% contendo as seguintes informações: local de coleta, data, ambiente, ecótopo. Após o período de coleta as amostras foram transportadas para o Laboratório de Ecologia e Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA), no ILMD, e armazenados em geladeira.





**Figura 8.** Representação gráfica do esquema de coleta de flebotomíneos, em estratificação vertical e estratificação horizontal, no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, 2016.



**Figura 9:** Captura de flebotomíneos em estratificação vertical, plataforma Maria Gusmão. A) Coleta realizada no dossel. B) Armadilha HP na base de árvore. Acervo: EDTA





**Figura 10:** Captura de flebotomíneos em estratificação horizontal. A) Peridomicílio, B) Borda de Floresta e C) Floresta. Acervo: EDTA

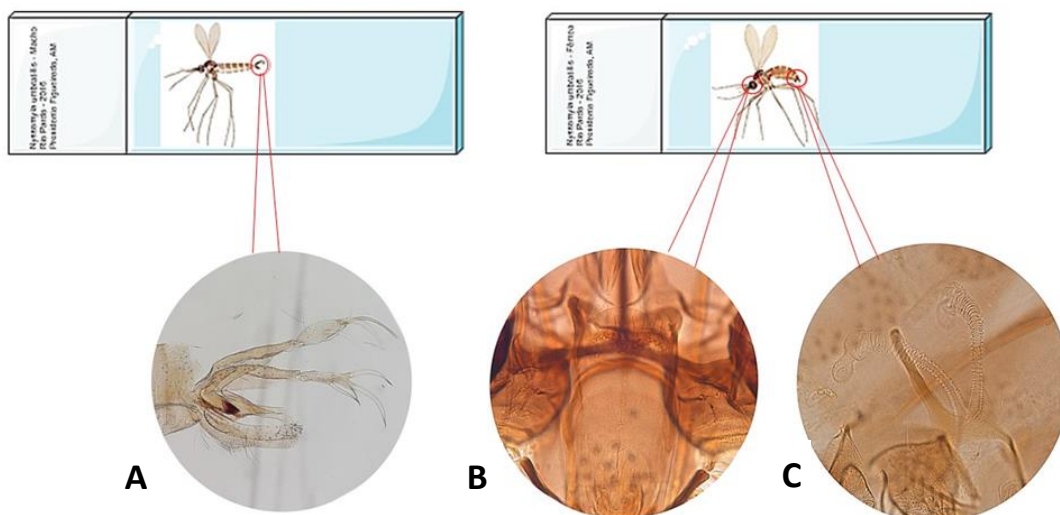
#### 4.2 Montagem de Lâminas e Identificação de Flebotomíneos:

Os tubos, contendo os flebotomíneos coletados, foram retirados da geladeira e transferidos individualmente, de um por um, para um recipiente de vidro (placa de Petri). Posteriormente, então, foi realizada uma triagem, com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa), para separar os indivíduos machos das fêmeas.

Após a triagem, os indivíduos foram submetidos ao método de diafanização, que consistiu em submeter os flebotomíneos em de solução de hidróxido de potássio, tendo como finalidade, possibilitar a visualização das estruturas morfológicas (externas e internas) que são utilizadas na identificação das espécies. Nesse processo, os machos, foram submetidos por inteiro e as fêmeas foram dissecadas e apenas cabeça e os três últimos segmentos abdominais. O tórax e parte do abdômen de cada fêmeas foi colocado em microtubos de 20  $\mu$ L, contendo as informações da coleta e contendo álcool absoluto, posteriormente o material foi armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização nas demais metodologias.

Para a realização da montagem de lâminas, os flebotomíneos foram dispostos em lâmina, com o auxílio de uma lupa e estiletos entomológicos, com uma gota de fluido de Berlese, em seguida estes foram alinhados de modo a facilitar a visualização e identificação das estruturas anatômicas (Figura 11).

Para a identificação das espécies dos flebotomíneos foram utilizadas chaves dicotômicas propostas por YOUNG e DUNCAN (1994), e a classificação taxonômica utilizada foi baseada na foi proposta depor GALATI (2003) e as abreviaturas dos gêneros seguiu proposta de MARCONDES (2007).



**Figura 11.** Estruturas taxonômicas utilizadas para identificação das espécies de flebotomíneos. Espécie *Ny. umbratillis* A. Estruturas genitais do macho, B. Cibário (fêmea) C. Espermateca (fêmea) Fonte: Acervo EDTA.

### 4.3 Extração de DNA:

Após a etapa de identificação, o material armazenado (tórax e parte do abdômen) das fêmeas foi agrupado em *pools* de no máximo 10 indivíduos dispostos em microtubo de 1,5 mL e identificados utilizando os seguintes critérios: espécie, mês de coleta, tipo de ambiente e de ecótopo. As extrações do material genético foram realizadas seguindo o protocolo do kit de extração DNeasy® Blood and Tissue Kit Qiagen com uma pequena adaptação segundo o protocolo de RESADORE et al., (2019) (Figura 10).

Inicialmente, os *pools* foram submetidos ao aquecimento com o auxílio de termobloco a 37°C por aproximadamente 10 minutos, para evaporação total do álcool, em seguida, os *pools* foram retirados do termobloco. Posteriormente foram adicionados, em cada *pool*, 1500 µL de água destilada autoclavadas e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos, após este tempo foram adicionados mais 1500 µL de água e esperou-se 20 minutos. Em seguida a água foi retirada e seguiu-se o protocolo de extração.

Foi adicionado, em cada *pool*, 180 µL de Buffer ATL. Em seguida foi realizada a maceração manual de cada *pool* com auxílio de pistilos autoclavados. Posteriormente, adicionou-se 2,5 µl de proteinase K em cada *pool* e foram levados ao vortex por 15 segundos. Os *pools* foram incubados a 56°C overnight (max. 18hs) para lise total das amostras.

No dia seguinte, foram adicionados 200µl de Buffer AL em cada *pool* em seguida foram levados ao vortex por 15 segundos. Após, foram adicionados 200µl de etanol (96-100%) e foram levados ao vortex por 10 segundos. Depois, a amostra foi transferida para microtubo com coluna (DNeasy mini spin columns) previamente identificado e levado para centrifugação por 2 minutos à 8000 rpm.

Após a centrifugação, foi descartado o tubo coletor e substituído por outro. Adicionou-se 500µl de Buffer AW1 e foi levado para centrifugar por 2 minutos à 8000 rpm. Em seguida o líquido no tubo coletor foi descartado e o tubo reutilizado. Seguiu-se adicionando 500µl de Buffer AW2 e centrifugando a amostra por 4 minutos à 14000 rpm.

Descartou-se o líquido do tubo coletor e centrifugou-se a amostra por 1 minuto à 14000 rpm, para certificar-se de que a membrana da coluna estivesse seca. Após a centrifugação, retirou-se a coluna e descartou-se o tubo coletor. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1.5 ml e adicionou-se 50µl de Buffer AE.

As amostras foram incubadas no termobloco por 10 minutos à 37°C. Após, foram adicionados mais 50µl de Buffer AE e as amostras foram incubadas novamente por 10 minutos à 37°C. Depois, foram levadas a centrifugação por 2 minutos à 8000 rpm. Em seguida, a coluna foi removida e descartada e o precipitado que ficou nos microtubos foi quantificado e verificadas a pureza do DNA em aparelho espectrofotômetro e armazenado a - 20°C para posterior utilização na PCR.

#### 4.4 PCR Para Detecção de *Leishmania* sp.:

Para a detecção da presença de DNA de *Leishmania* nas amostras, foi realizada uma PCR convencional dirigida para a região Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) que constitui uma região transcrita não codificante, localizada entre as subunidades pequena e grande de genes de rRNA e é separado pelo gene rRNA 5.8s. O protocolo seguido foi o proposto por EL TAI et al., (2000) onde a amplificação ocorreu para um fragmento de aproximadamente 350pb com os seguintes primers: L5.8S(5'-TGATACCACTTATCGCACIT-3') e L5.8SR/(5'-AAGTGCGATAAGTGGTA-3')

O kit de PCR utilizado foi o GoTaq® DNA Polymerase, Promega. O mix da reação foi preparado nas seguintes concentrações: 9µl de água ultrapura (Nuclease-Free Water, Promega), 5µl de Tampão 5x (5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,25µl de DMSO, 0,5µl de dNTP (10mM), 1,25µl de cada primer, 0,25µl de Taq DNA (GoTaq® DNA Polymerase), 5µl da amostra, para um volume final de 25µl.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador Eppendorf® Mastercycle Personal nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 1 minuto (hibridização dos primers), 72°C por 1 minuto (extensão das fitas) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos obtidos da PCR convencional foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com 7 µl brometo de Etídio. Foi utilizado um peso molecular de 100 pb (Kasvi®) de acordo com instruções do fabricante. O tampão de corrida utilizado foi TAE 0.5%. Os géis foram submetidos a 100 volts de potência por 25 minutos. E por fim, visualizados sob luz ultra-violeta em câmara escura e fotodocumentados.

#### 4.5 PCR-RFLP Para Identificação de Espécies de *Leishmania*:

Para identificação a nível de espécies de *Leishmania*, o produto amplificado das amostras positivas para a PCR do alvo ITS1 foram submetidas a PCR-RFLP (Polimorfismo de Fragmentos de Restrição) seguindo o protocolo de CARVALHO et al., (2016). A técnica é baseada na restrição de um fragmento de DNA por endonucleases que clivam esta molécula em sítios específicos gerando perfis de restrição, tem mostrado resultados promissores para a caracterização de *Leishmania*. (CARVALHO et al., 2016)

O mix da reação foi preparado de acordo com as seguintes concentrações: 1,5 µl de Buffer 10x, 0,15 µl de BSA, 0,5 µl de *HaeIII*, 10-15 µl do produto amplificado, 0-4.80 µl de água ultrapura, para um volume final de 15µl. O volume de água na reação é calculado de acordo com o volume de produto amplificado que será utilizado, podendo não ser necessária a adição de água na reação.

As reações foram incubadas no termobloco Bioplus IT-2002® por 2 horas à 37°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 4% corado com 10µl de brometo de Etídio. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 0.5%. Os géis foram submetidos à 90 volts de potência por aproximadamente 1h30 minutos. Por fim, foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

#### 4.6 Análises Estatísticas:

Os dados referentes as informações das coletas e identificações das espécies foram armazenadas em formato de tabelas no programa Microsoft® Excel 2007 para WINDOWS. As análises estatísticas foram realizadas nos programas Dives, Past e RStudio®.

A abundância foi estimada através do número total de indivíduos coletados. A riqueza foi estimada pelo número de espécies coletadas. A diversidade de espécies foi calculada utilizando o índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), que é constituído pelo número e equitabilidade de espécies, e adicionalmente foi usado o índice de Rényi que agrega os índices de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e índice de Simpson ( $D$ ).

A uniformidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies foi calculada pelo índice de equitabilidade de Pielou ( $J'$ ) que permite representar a uniformidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies existentes e para avaliar a semelhança entre as espécies coletadas nos ambientes foi calculado o índice de Similaridade de Jaccard ( $C_j$ ) que compara qualitativamente a semelhança entre espécies ao longo de um gradiente ambiental (MAGURRAN, 2005).

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar o número de espécies coletadas de cada ambiente (peridomicílio, borda florestal e floresta). Para verificar a influência dos ambientes sobre a composição das espécies de flebotomos será feita uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), que consiste em uma análise não paramétrica multivariada baseada em permutações.

Além disso, utilizamos uma Escala Dimensional Não Métrica (NMDS) para representar a posição dessas comunidades em um espaço multidimensional. Para calcular o esforço amostral realizado no estudo, foram utilizadas Curvas de Rarefações das Espécies em função da frequência de indivíduos. O Valor de Indicação de Espécies (IndVal) foi realizado para verificar a fidelidade e especificidade que as espécies apresentam com um determinado ambiente.

Para estimar a taxa de infecção nas amostras positivas para *Leishmania*., foi realizado o cálculo para a taxa de infecção mínima de acordo com Paiva et al. (2007) com a seguinte fórmula: Taxa mínima (TM) = N° de grupos positivos (pools) x 100/Total de flebotomíneos processados.

Fórmulas dos índices de diversidade, equitabilidade e similaridade que serão utilizados no estudo:

❖ **Índice de Shannon-Wiener (H')**

$$H' = \frac{\left[ N \ln(N) - \sum_{i=1}^S n_i \ln(n_i) \right]}{N}$$

H' = Índice de Shannon-Wiener.

$n_i$  = Número de indivíduos amostrados da  $i$ -ésima espécie.

N = Número total de indivíduos amostrados.

S = Número total de espécies amostradas.

ln = logaritmo de base neperiana.

❖ **Equitabilidade de Pielou (J')**

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

H max = ln(S)

J' = Equitabilidade de Pielou.

S = Número total de espécies amostradas.

H' = Índice de diversidade de Shannon-Wiener.

❖ **Similaridade de Jaccard (Cj)**

$$J' = \frac{S_{com}}{s_1 + s_2 - S_{com}} \quad \text{Similaridade de Jaccard}$$

$S_{com}$  = Número de espécies comuns em duas amostras.

$s_1$  e  $s_2$  = Número total de espécies em cada uma das amostras.

S = Total de espécies no conjunto da amostra.

## 5. RESULTADOS:

### 5.1 Distribuição Geral de Flebotomíneos:

Foram coletados um total de 3.186 flebotomíneos, pertencentes a 13 gêneros e 52 espécies (Tabela 1). As fêmeas totalizaram 1751 indivíduos e os machos 1435, a proporção macho/ fêmea foi de 1:1,2 não sendo observado diferença estatística entre os sexos (Mann-Whitney:  $p=0,4021$ ).

Os gêneros mais abundantes foram *Nyssomyia* com 1390 indivíduos e 6 espécies seguido de *Psychodopygus*, 517 indivíduos e 7 espécies, e *Bichromomyia* com 311 indivíduos e 3 espécies. As espécies mais abundantes foram, respectivamente, *Ny. umbratillis* (21,80%), *Ny. anduzei* (8,47%), *Ny. antunesi* (7,87%), *Sc. nematoducta* (5,43%), *Ny. yulli yulli* (5,17%), *Mi. rorotaensis* (4,51%), *Bi. flaviscutellata* (4,33%) e *Ps. Amazonensis* (3,86%). As demais espécies representaram entre 2-1% da amostragem total.

Algumas espécies obtiveram pouquíssimos indivíduos coletados. As espécies *Br. pintoii*, *Pr. triacanta* e *Pr. trispinosa* foram coletados dois indivíduos de cada, já as espécies *Ev. cerqueirai*, *Ny. richardwardi* e *Pa. campbelli* foi coletado um exemplar de cada durante o estudo. Alguns espécimes foram identificados apenas até o nível de gênero, estes pertencem a *Trichophoromyia* sp. ( $n=35$ ) e *Psathyromyia* sp. ( $n=22$ ).

### 5.2 Estratificação Vertical de Flebotomíneos – Dossel e Solo:

Os ambientes de dossel e solo totalizaram 1.296 flebotomíneos. A abundância foi relativamente maior no solo ( $n=785$ ) em comparação com dossel ( $n=511$ ), no entanto, não houve diferença significativa entre os ambientes (Mann-Whitney:  $p=0,0655$ ). A espécie mais abundante em ambos os estratos foi *Ny. umbratillis*.

A riqueza de espécies entre os ambientes também não apresentou diferença significativa (Mann-Whitney:  $p=0,6159$ ), solo obteve 39 espécies e 4 espécies foram exclusivas deste ambiente: *Br. brumpti*, *Ev. williansi*, *Mi. micropiga* e *Mi. pilosa*. O dossel obteve 37 espécies e 3 foram exclusivas deste ambiente: *Pa. cuzquena*, *Ny. shawi* e *Ev. cerqueirai*.

De acordo com o Índice de diversidade de Shannon-Wiener o ambiente de solo demonstrou maior diversidade ( $H'=4,3733$ ) do que o dossel ( $H'=3,5346$ ). O teste T para diversidade demonstrou diferença significativa entre os ambientes ( $p=0,00017$ ) indicando que há uma diferença na composição de espécies entre eles.

**Tabela 1:** Espécies de flebotomíneos capturados por armadilhas HP em modelo de estratificação vertical (Solo e Dossel) e estratificação Horizontal (Floresta, Borda de floresta e Peridomicílio) no Assentamento Rural Rio Pardo, em Presidente Figueiredo - AM, no período de junho e julho, agosto e setembro de 2016 40

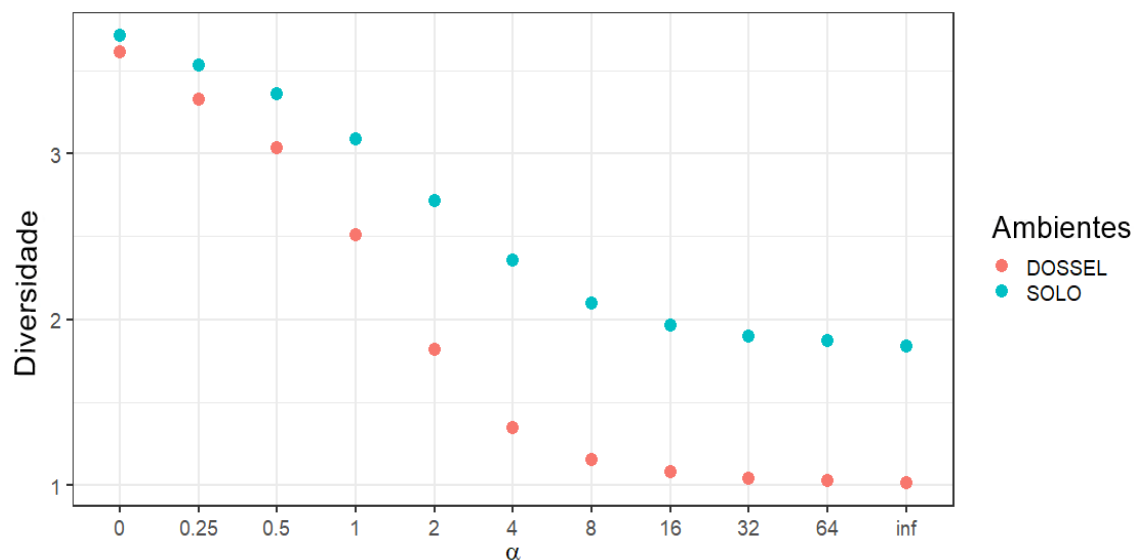
Espécies	Estratificação Vertical						Estratificação Horizontal						Total	%
	♀	♂	Dossel	%	Solo	%	Floresta	%	Borda	%	Peridomicílio	%		
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	78	60	5	0,97%	70	8,91%	28	2,56%	30	5,95%	5	1,70%	138	4,33%
<i>Bichromomyia olmeca nociva</i>	69	30	6	1,17%	49	6,24%	27	2,47%	17	3,37%	-	-	99	3,10%
<i>Bichromomyia reducta</i>	61	14	3	0,58%	32	4,07%	28	2,56%	12	2,38%	-	-	75	2,35%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	5	2	-	-	1	0,01%	5	0,45%	1	0,01%	-	-	7	0,21%
<i>Brumptomyia pintoii</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	2	0,39%	-	-	2	0,06%
<i>Evandromyia cerqueirai</i>	-	1	1	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,03%
<i>Evandromyia inpai</i>	9	30	4	0,78%	12	1,52%	14	1,28%	8	1,58%	1	0,01%	39	1,22%
<i>Evandromyia monstrosa</i>	20	14	1	0,00%	16	2,03%	8	0,73%	8	1,58%	1	0,01%	34	1,06%
<i>Evandromyia pinotti</i>	19	-	1	0,00%	4	0,50%	7	0,64%	6	1,19%	1	0,01%	19	0,59%
<i>Evandromyia saulensis</i>	13	11	1	0,00%	-	-	16	1,46%	5	0,99%	2	0,68%	24	0,75%
<i>Evandromyia sericea</i>	21	43	4	0,78%	21	2,67%	13	1,19%	7	1,38%	19	6,46%	64	2,00%
<i>Evandromyia walkeri</i>	37	7	1	0,01%	5	0,63%	18	1,64%	14	2,77%	6	2,04%	44	1,38%
<i>Evandromyia williamsi</i>	-	8	-	-	5	0,63%	1	0,01%	-	-	2	0,68%	8	0,25%
<i>Lutzomyia flabellata</i>	-	3	-	-	-	-	3	0,27%	-	-	-	-	3	0,09%
<i>Lutzomyia gomezi</i>	21	2	1	0,01%	9	1,14%	10	0,91%	3	0,59%	-	-	23	0,72%
<i>Lutzomyia sherlocki</i>	8	1	1	0,01%	3	0,38%	2	0,18%	-	-	3	1,02%	9	0,28%
<i>Micropigomyia micropyga</i>	2	15	-	-	1	0,01%	10	0,91%	2	0,39%	4	1,36%	17	0,53%
<i>Micropigomyia pilosa</i>	4	-	-	-	2	0,25%	1	0,01%	1	0,01%	-	-	4	0,12%
<i>Micropigomyia rorotaensis</i>	104	40	8	1,56%	32	4,07%	68	6,23%	22	4,36%	14	4,76%	144	4,51%
<i>Nyssomyia anduzei</i>	171	99	35	6,84%	57	7,26%	112	10,26%	44	8,73%	22	7,48%	270	8,47%
<i>Nyssomyia antunesi</i>	110	141	16	3,13%	29	3,69%	54	4,94%	42	8,33%	110	37,41%	251	7,87%
<i>Nyssomyia richardwardi</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,01%	1	0,03%
<i>Nyssomyia shawi</i>	5	1	2	0,39%	-	-	3	0,27%	-	-	1	0,00%	6	0,18%
<i>Nyssomyia umbratillis</i>	368	329	185	36,20%	125	15,90%	297	27,20%	68	13,49%	22	7,48%	697	21,80%
<i>Nyssomyia yulli yulli</i>	45	120	52	10,17%	38	4,84%	71	6,50%	-	-	4	1,36%	165	5,17%
<i>Pressatia choti</i>	5	8	-	-	7	0,89%	2	0,18%	4	0,79%	-	-	13	0,40%
<i>Pressatia triacanta</i>	1	1	-	-	2	0,25%	-	-	-	-	-	-	2	0,06%
<i>Pressatia trispinosa</i>	-	2	-	-	1	0,01%	1	0,01%	-	-	-	-	2	0,06%
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	5	10	2	0,39%	5	0,63%	5	0,45%	1	0,01%	2	0,68%	15	0,47%



<i>Psathyromyia aragoai</i>	2	9	1	0,01%	1	0,01%	6	0,54%	1	0,01%	2	0,68%	11	0,34%
<i>Psathyromyia campbelli</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,01%	-	-	1	0,03%
<i>Psathyromyia cuzquena</i>	-	5	2	0,39%	-	-	3	0,27%	-	-	-	-	5	0,15%
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	4	6	1	0,01%	-	-	1	0,01%	7	1,38%	1	0,01%	10	0,31%
<i>Psathyromyia inflata</i>	28	2	6	1,17%	7	0,89%	10	0,91%	6	1,19%	1	0,01%	30	0,94%
<i>Psathyromyia lutziana</i>	7	3	4	0,78%	1	0,01%	2	0,18%	3	0,59%	-	-	10	0,31%
<i>Psathyromyia scaffii</i>	21	4	3	0,58%	9	1,14%	5	0,45%	8	1,58%	-	-	25	0,78%
<i>Psathyromyia spp.</i>	17	5	-	-	5	0,63%	6	0,54%	6	1,19%	5	1,70%	22	0,69%
<i>Psychodopygus amazonensis</i>	59	64	34	6,65%	30	3,82%	37	3,39%	17	3,37%	5	1,70%	123	3,86%
<i>Psychodopygus carreirai</i> <i>carreirai</i>	36	12	15	2,93%	11	1,40%	14	1,28%	6	1,19%	2	0,68%	48	1,50%
<i>Psychodopygus chagasi</i>	25	25	22	4,30%	18	2,29%	3	0,27%	4	0,79%	3	1,02%	50	1,56%
<i>Psychodopygus clautreii</i>	40	58	21	4,10%	24	3,05%	32	2,93%	17	3,37%	4	1,36%	98	3,07%
<i>Psychodopygus davisi</i>	63	30	19	3,71%	27	3,43%	28	2,56%	17	3,37%	2	0,68%	93	2,91%
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	73	1	19	3,71%	14	1,78%	24	2,19%	17	3,37%	-	-	74	2,32%
<i>Psychodopygus squamiventris</i> <i>squamiventris</i>	25	5	2	0,39%	10	1,27%	5	0,45%	8	1,58%	5	1,70%	30	0,94%
<i>Sciopemyia nematoducta</i>	75	98	14	2,73%	78	9,93%	33	3,02%	28	5,55%	19	6,46%	173	5,43%
<i>Sciopemyia pennyi</i>	-	6	-	-	-	-	3	0,27%	-	-	3	1,02%	6	0,18%
<i>Sciopemyia sordelli</i>	30	3	1	0,01%	9	1,14%	7	0,64%	5	1,00%	11	3,74%	33	1,03%
<i>Trichophoromyia eurypyga</i>	-	86	14	2,73%	7	0,89%	30	2,74%	28	5,55%	7	2,38%	86	2,69%
<i>Trichophoromyia gibba</i>	-	7	-	-	-	-	6	0,54%	1	0,01%	-	-	7	0,21%
<i>Trichophoromyia spp.</i>	34	1	1	0,01%	-	-	20	1,83%	13	2,57%	1	0,01%	35	1,09%
<i>Trichopygomyia trichopyga</i>	1	10	-	-	-	-	6	0,54%	3	0,59%	2	0,68%	11	0,34%
<i>Viannamyia furcata</i>	15	1	1	0,01%	5	0,63%	3	0,27%	6	1,19%	1	0,01%	16	0,50%
<i>Viannamyia tuberculata</i>	13	-	2	0,39%	3	0,38%	3	0,27%	5	1,00%	-	-	13	0,40%
<b>TOTAL</b>	1751	1435	511	100%	785	100%	1091	100%	504	100%	294	100%	3186	100,00%

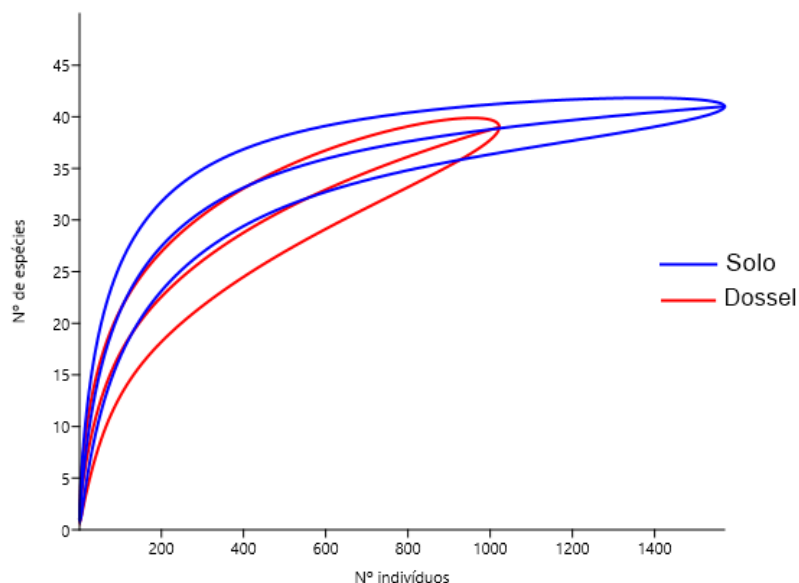
O índice de equitabilidade também indicou que o ambiente de solo ( $J'=0,8596$ ) foi mais homogêneo na distribuição das espécies entre os ambientes, quando comparado com o ambiente de dossel ( $J'=0,7135$ ), este último, obteve maior valor no índice de dominância de Berger-Parker (0,3685) devido a predominância da espécie *Ny. umbratillis* em relação as demais no mesmo ambiente e em comparação com a abundância desta espécie no ambiente de solo (0,1609).

O Perfil de Diversidade de Rényi representa estes resultados em forma de gráfico, os pontos azuis representam o solo e os cor de rosa o dossel, assim, é possível observar que a curva do ambiente solo se superpõe a dossel, corroborando com a maior diversidade observada neste ambiente. A dominância observada no dossel é representada pelo declínio acentuado da curva deste ambiente, que fez com que sua diversidade e equitabilidade fossem menores (Figura 12).



**Figura 12.** Perfil de diversidade de Rényi de flebotomíneos coletados nos ambientes de Solo e Dossel no assentamento rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, 2016. 1 – Índice de Shannon, 2 = Índice de Simpson, 4 =  $\alpha$  (log de riqueza), Inf = Índice de Berger Parker.

A curva de acumulação de espécies demonstrou que, no ambiente de solo, foi alcançada a estabilidade, indicando que, para este ambiente, a amostragem foi eficiente e o número esperado de espécies foi obtido, assim, alcançando a riqueza máxima. Já para o ambiente de dossel, a curva ainda apresenta tendência ao crescimento, indicando que, para este, ainda são necessárias algumas coletas para alcançar a riqueza total de espécies existentes neste ambiente (Figura 13).



**Figura 13.** Curvas de rarefação representando a riqueza acumulativa de espécies de flebotomíneos coletados por armadilhas HP nos ambientes de dossel e solo no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro 2016.

### 5.3 Estratificação Horizontal de Flebotomíneos – Floresta, Borda de floresta e Peridomicílio:

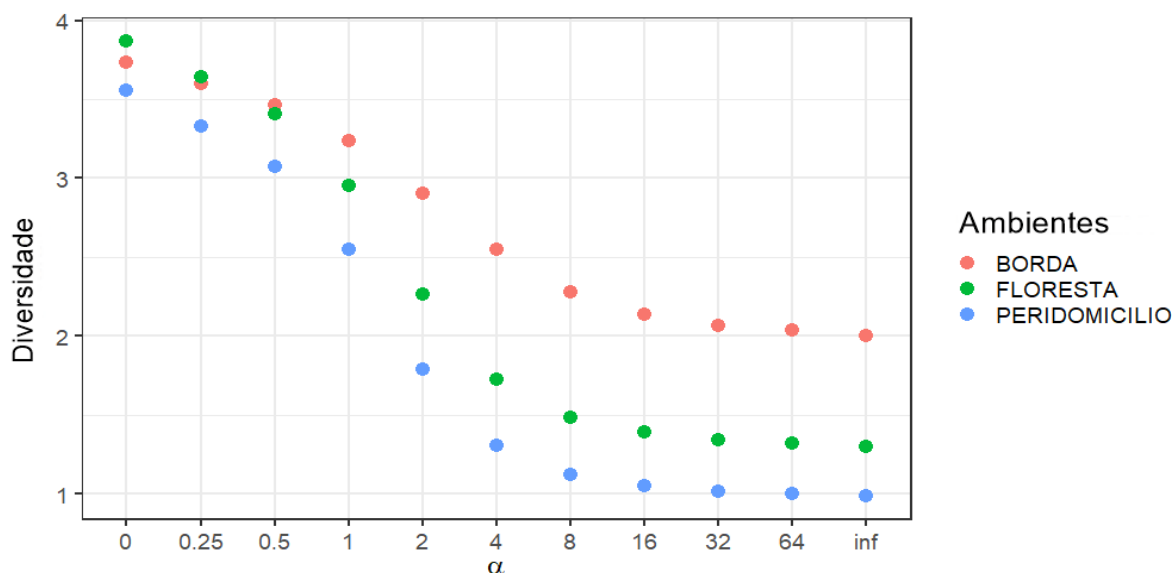
Os ambientes de floresta, borda e peridomicílio totalizaram 1.889 flebotomíneos coletados. A abundância foi maior na floresta onde foram obtidos 1.091 indivíduos, seguido de borda com 504 e peridomicílio com 294 indivíduos. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre o número de indivíduos presentes nos ambientes (Kruskal-Wallis:  $p=0,001$ ), e para determinar quais destes ambientes apresentaram diferença entre as abundâncias, foi realizado um teste de comparações múltiplas (Dunn's Multiples Comparisons) que demonstrou diferença significativa entre os ambientes de floresta/peridomicílio ( $p= <0,001$ ) e borda/peridomicílio ( $p=0,0122$ ).

A riqueza de espécies foi maior na floresta ( $n=48$ ), onde as espécies *Ny. umbratillis* e *Ny. anduzei* foram as mais abundantes. Na borda foram observadas 42 espécies e apenas a espécie *Ny. umbratillis* obteve um valor relativamente maior em comparação com os demais presentes neste ambiente. No ambiente de peridomicílio foram observadas 35 espécies e a espécie predominante foi *Ny. antunesi*.

A diversidade foi relativamente maior no ambiente de borda ( $H'=4,6434$ ), seguido de floresta ( $H'=4,221$ ) e peridomicílio ( $H'=3,6596$ ). Para verificar a diferença na composição de espécies entre os ambientes foi utilizado o teste PERMANOVA, que indicou diferença significativa entre os ambientes ( $p=0,0026$ ).

A equitabilidade também foi maior no ambiente de borda ( $J=0,8725$ ), indicando que neste ambiente, a distribuição das espécies foi mais homogênea em comparação com o ambiente de floresta ( $J=0,7686$ ) e peridomicílio ( $J=0,7193$ ), este último, por sua vez, obteve maior valor no índice de dominância ( $d=0,3855$ ) devido à presença massiva da espécie *Ny. antunesi*.

O perfil de diversidade de Rényi representa graficamente os resultados supracitados. Os pontos verdes correspondem ao ambiente de floresta, os pontos cor de rosa ao ambiente de borda e os pontos azuis ao ambiente de peridomicílio. Assim, o início da curva demonstra, respectivamente, a abundância dos ambientes de floresta, borda e peridomicílio. Em seguida, a curva do ambiente de floresta começa a declinar e a curva do ambiente de dossel sobressai a esta, demonstrando a maior diversidade e equitabilidade deste ambiente. O ambiente de peridomicílio apresentou a curva mais baixa e em direção a direita, indicando maior dominância, corroborando com o resultado apresentado anteriormente (Figura 14).

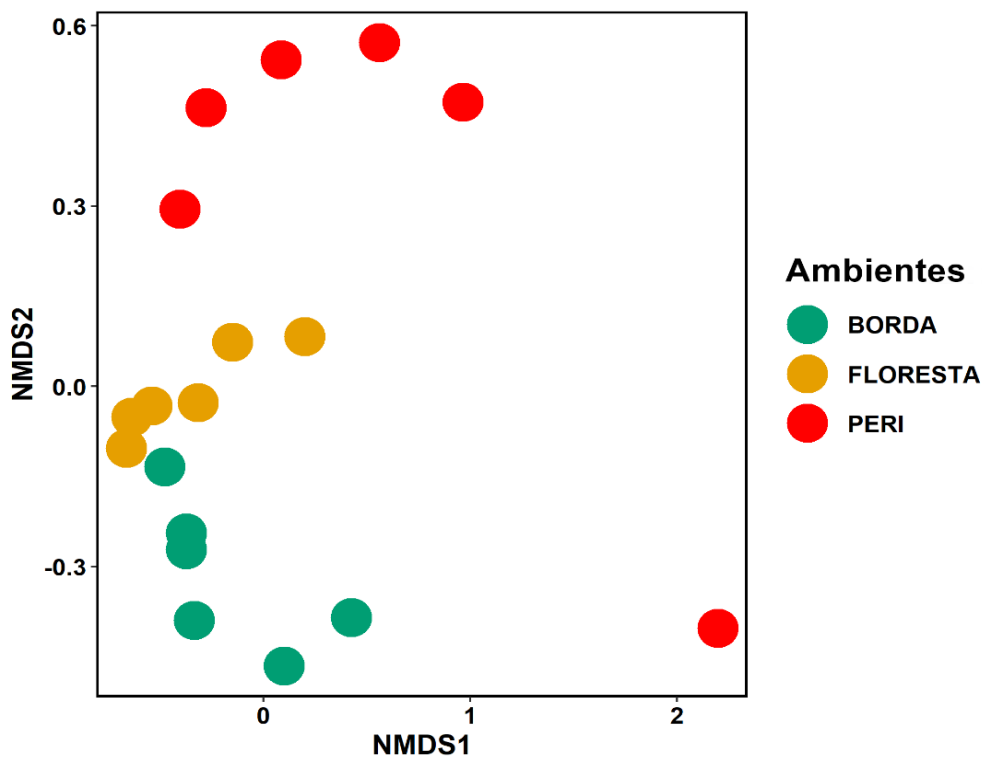


**Figura 14.** Perfil de diversidade de Rényi das coletas de flebotomíneos por armadilhas HP nos ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio, do assentamento rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil, meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.

O índice de Jaccard demonstrou similaridade entre os seguintes ambientes: floresta/borda: 0,83; floresta/peridomicílio: 0,72; borda/peridomicílio: 0,63, respectivamente. Os ambientes de floresta e borda compartilharam 41 espécies entre si, borda e peridomicílio compartilharam 34 espécies, e floresta e peridomicílio compartilharam 30 espécies.

O ambiente de floresta apresentou 3 espécies exclusivas: *Lu. flabellata*, *Pr. trispinosa* e *Pa. cuzquena*, borda apresentou 2 espécies exclusivas: *Br. pintoii*, *Pa. Campbellei* e o peridomicílio apresentou 1 espécie exclusiva: *Ny. richardwardi*.

O Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), baseado na dissimilaridade de Bray-Curtis, corroborou com os resultados citados acima, demonstrando que a composição de espécies nos ambientes de floresta e borda são mais semelhantes do que com o ambiente de peridomicílio (Figura 15).



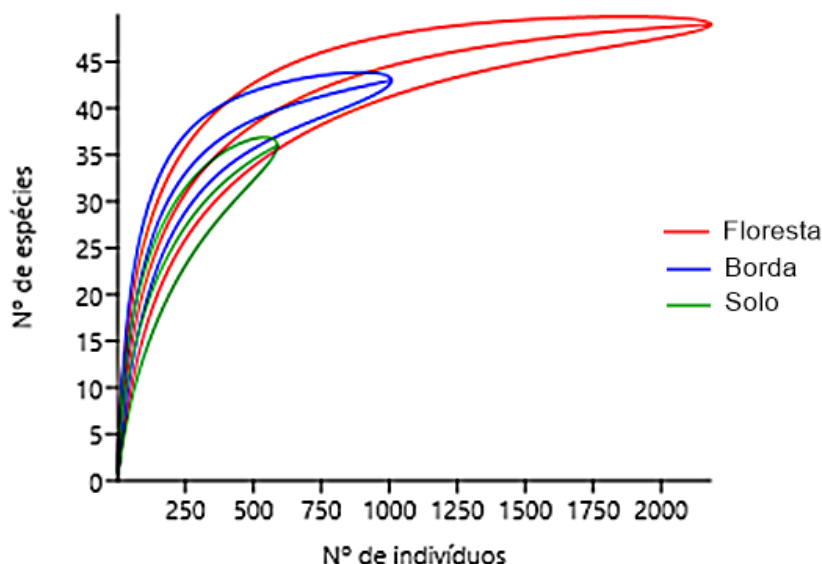
**Figura 15.** Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) para os ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio do assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas em 2016.

A análise do Valor de Indicação de Espécies (IndVal), identificou 14 espécies com potenciais valores de bioindicação, a maior parte delas associadas ao ambiente de floresta como é o caso de *Ny. yulli yulli* que obteve 95% de indicação e uma frequência de 10 indivíduos, e *Ny. umbratillis* que obteve 77% de associação com floresta, e frequência de 18 indivíduos. Duas espécies foram associadas ao ambiente de borda, *Pa. dreisbachi* com 78% e *Vi. furcata* com 60%. A única espécie associada ao ambiente de peridomicílio foi *Ny. antunesi* com 54% de indicação e frequência de 18 indivíduos.

**Tabela 2.** Valor de indicação de espécies (IndVal) de flebotomíneos coletados por armadilhas HP nos ambientes de floresta, borda e peridomicílio no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo - AM, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.

INDVAL				
Espécies	Ambiente	%	pvalor	Frequência
<i>Ny. yulli.yulli</i>	Floresta	95%	0,002	10
<i>Lu. gomezi</i>	Floresta	77%	0,012	9
<i>Ny. umbratillis</i>	Floresta	77%	0,001	18
<i>Bi. reducta</i>	Floresta	70%	0,001	10
<i>Pa. aragoai</i>	Floresta	66%	0,017	9
<i>Mi. rorotaensis</i>	Floresta	65%	0,008	16
<i>Ny. anduzei</i>	Floresta	63%	0,005	18
<i>Ps. amazonensis</i>	Floresta	63%	0,016	14
<i>Bi. olmca nociva</i>	Floresta	61%	0,022	10
<i>Ps. davisii</i>	Floresta	60%	0,019	12
<i>Ps. hirsutus</i>	Floresta	58%	0,035	12
<i>Pa. dreisbachi</i>	Borda	78%	0,004	8
<i>Vi. furcata</i>	Borda	60%	0,028	10
<i>Ny. antunesi</i>	Peridomicílio	54%	0,032	18

A curva de acumulação de espécies demonstrou que, no ambiente de floresta foi obtida a estabilidade da curva, indicando que o número de espécies esperadas foi alcançado. Este fato também ocorreu para o ambiente de borda, que também obteve a estabilidade da curva. Em contrapartida, o ambiente de peridomicílio não alcançou estabilidade, demonstrando tendência ao crescimento e assim, indicando a necessidade de mais coletas neste ambiente (Figura 16).



**Figura 16.** Curvas de rarefação representando a riqueza acumulativa de espécies de flebotomíneos nos ambientes de Floresta, Borda e Peridomicílio no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.

#### 5.4 Abundância e Diversidade de Espécies Vektoras:

Dos 3.186 flebotomíneos coletados, 1.772 (55,6%) indivíduos de 10 espécies são incriminados ou suspeitos como vetores de agentes da LT no Brasil (Tabela 3). A espécie mais abundante foi *Ny. umbratillis*, seguida de *Ny. anduzei* e *Ny. antunesi*. Todas as espécies, com exceção de *Bi. olmeca nociva* e *Lu. Gomezi*, foram coletadas em todos os ambientes, em proporções variadas.

Com relação a composição faunística, o Solo foi mais abundante em comparação com Dossel, não sendo observada diferença significativa ( $p=0,1282$ ). A espécie *Ny. umbratillis* foi a mais abundante em ambos os ambientes, seguida de *Ny. anduzei* e *Ny. antunesi* no dossel, e no solo, das espécies abundantes foram *Bi. flaviscutellata* e *Ny.*

A diversidade também foi maior no solo em relação ao dossel, e os ambientes demonstraram diferença significativa ( $p= 0,000328$ ). A riqueza de espécies foi igual para ambos, e a equitabilidade foi maior no solo.

Na estratificação horizontal, o ambiente de floresta foi o mais abundante, seguido de borda e peridomicílio. Na floresta, a espécie mais abundante foi *Ny. umbratillis*, seguida de *Ny. anduzei*. Na borda não houve dominância de uma espécie específica, apesar de *Ny. umbratillis* ter uma proporção um pouco maior em relação as demais espécies, a composição neste ambiente foi mais equilibrada, assim, sendo observada maior equitabilidade, em comparação com o ambiente de floresta e peridomicílio.

A diversidade também foi maior no ambiente de borda, seguido de floresta e peridomicílio. A riqueza de espécies foi igual nos ambientes de floresta e borda, e no peridomicílio apenas duas espécies não ocorreram. A espécie *Ny. antunesi* foi predominante no peridomicílio.

**Tabela 3.** Espécies de flebotomíneos, vetores e putativos, capturados por armadilha HP em diferentes ambientes no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo – AM, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.

Espécies	♀	♂	Dossel	Solo	Floresta	Borda	Peridomicílio	Total	%
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	78	60	5	70	28	30	5	138	7,47
<i>Bichromomyia olmca nociva</i>	69	30	6	49	27	17	-	99	5,36
<i>Lutzomyia gomezi</i>	21	2	1	9	10	3	-	23	1,24
<i>Nyssomyia anduzei</i>	171	99	35	57	112	44	22	270	14,62
<i>Nyssomyia antunesi</i>	110	141	16	29	54	42	110	251	13,59
<i>Nyssomyia umbratillis</i>	368	329	185	125	297	68	22	697	37,7
<i>Psychodopygus amazonensis</i>	59	64	34	30	37	17	5	123	6,66
<i>Psychodopygus car. carreirai</i>	36	12	15	11	14	6	2	48	2,6
<i>Psychodopygus davisi</i>	63	30	19	27	28	17	2	93	5,03
<i>Psychodopygus sq. squamiventris</i>	25	5	2	10	5	8	5	30	1,62
<i>Psychodopygus hir. hirsutus</i>	73	1	19	14	24	17	-	74	4,08
<b>TOTAL</b>	1000	772	318	417	612	252	173	1846	100%
<b>H'</b>			2,09	2,89	2,39	2,89	1,76		
<b>J'</b>			0,62	0,87	0,72	0,87	0,58		

$H'$  = índice de diversidade de Shannon.

$J'$  = índice de equitabilidade de Pielou



### 5.5 Detecção e Identificação de *Leishmania sp.* em Flebotomíneos:

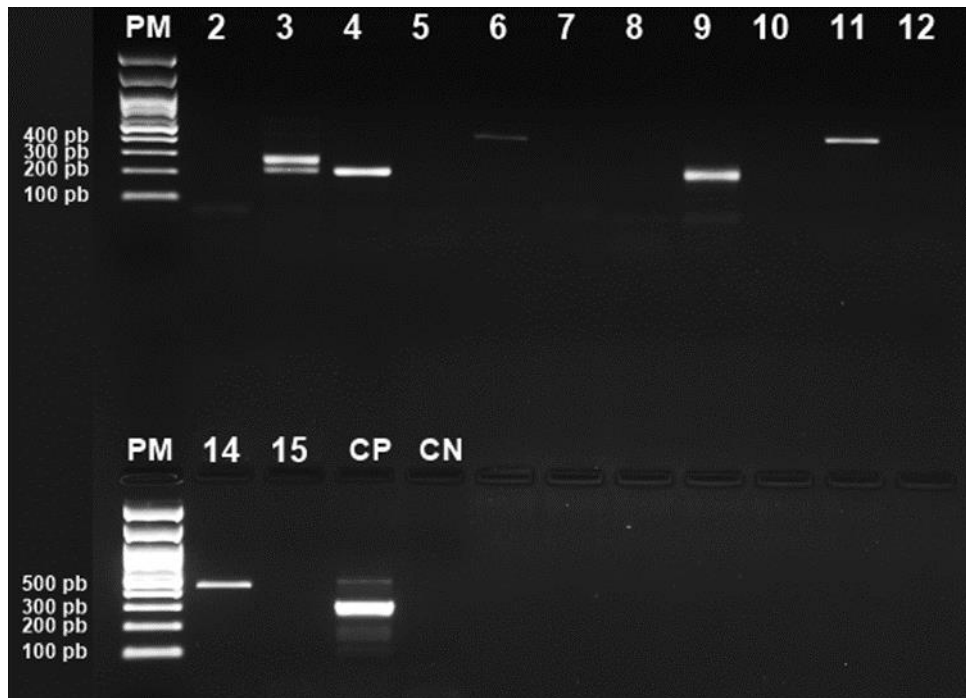
As fêmeas coletadas durante o estudo (n=1751) foram agrupadas em 365 pools. Deste total, foram escolhidos aleatoriamente 100 pools, totalizando 519 indivíduos amostrados (Tabela 4). A espécie *Ny. antunesi* obteve o maior número de pools (n=15), seguida de *Ny. anduzei* (n=14) e *Ny. umbratilis* (n=11). Em relação aos ambientes, solo obteve o maior número de pools com 43, seguido de dossel com 21 e borda com 19.

**Tabela 4.** Distribuição do número de pools de flebotomíneos analisados, por espécie e ambiente, do assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Amazonas, nos meses de junho, julho, novembro e dezembro de 2016.

Especies	TP	Dossel	Solo	Floresta	Borda	Peridomicílio
<i>Bi. flaviscutellata</i>	9	-	6	-	3	-
<i>Bi. olmeca nociva</i>	4	-	3	-	1	-
<i>Bi. reducta</i>	4	-	2	2	-	-
<i>Ev. monstruosa</i>	1	-	1	-	-	-
<i>Ev. saulensis</i>	1	-	-	1	-	-
<i>Ev. walkeri</i>	1	-	-	1	-	-
<i>Lu. Gomezzi</i>	1	-	1	-	-	-
<i>Mi. rorotaensis</i>	8	-	4	3	1	-
<i>Ny. anduzei</i>	14	3	3	2	3	3
<i>Ny. antunesi</i>	15	4	3	-	2	6
<i>Ny. umbratilis</i>	11	3	2	1	4	1
<i>Py. amazonensis</i>	4	3	-	1	-	-
<i>Py. carreirai</i>	2	-	1	-	1	-
<i>Py. chagasi</i>	1	1	-	-	-	-
<i>Py. clausitrei</i>	5	2	3	-	-	-
<i>Py. davisii</i>	4	2	1	-	1	-
<i>Py. hirsutus</i>	5	2	1	-	2	-
<i>Sc. nematoducta</i>	4	1	1	-	-	1
<i>Sc. sordellii</i>	3	-	1	1	-	1
<i>Vi. Tuberculata</i>	1	-	-	1	-	-
<i>Tr. Ubiquitalis</i>	1	-	-	-	1	-
<i>Vi. furcata</i>	1	-	1	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>34</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>12</b>

TP = Total de pools analisados.

Ao realizar a PCR convencional para o gene ITS1, seis *pools* apresentaram resultados positivos para *Leishmania* (Figura 17): um *pool* da espécie *Bi. flaviscutellata*, dois *pools* de *Sc. nematoducta*, um *pool* de *Ps. Amazonensis*, um *pool* de *Lu. gomezi* com cinco indivíduos, e 1 um *pool* de *Ny. anduzei* com nove indivíduos pertencentes ao ambiente de borda. No geral, a taxa mínima (TM) de infecção das amostras positivas foi de 1.15% (6 *pools*/519 fêmeas analisadas), as taxas mínimas de infecção individual, de cada *pool*/espécie está listado na Tabela 5.



**Figura 17.** Gel de agarose à 2%, corado com brometo de Etídio, mostrando produtos amplificados pela PCR ITS1. Canaletas: 1: Peso molecular de 100pb; 2: *Ps. carreirai carreirai*; 3: *Bi. flaviscutellata*; 4: *Sc. nematoducta*; 5: *Ny. umbratilis*; 6 e 7: *Ps. amazonensis*; 8: *Ps. davisii*; 9: *Sc. nematoducta*; 10: *Ny. umbratillis*; 11: *Lu. gomezi*; 12 e 13: *Ny. antunesi*; 14: *Ny. anduzei*; Controle positivo: *L. braziliensis* (Referência da cepa); Controle negativo: Mix da PCR sem amostra

**Tabela 5.** Distribuição dos pools positivos para infecção por *Leishmania* sp. utilizando o alvo ITS1, e taxa mínima de infecção em flebotomíneos coletados no Assentamento Rural Rio Pardo, Presidente Figueiredo – AM no período de junho, junho, agosto e setembro de 2016.

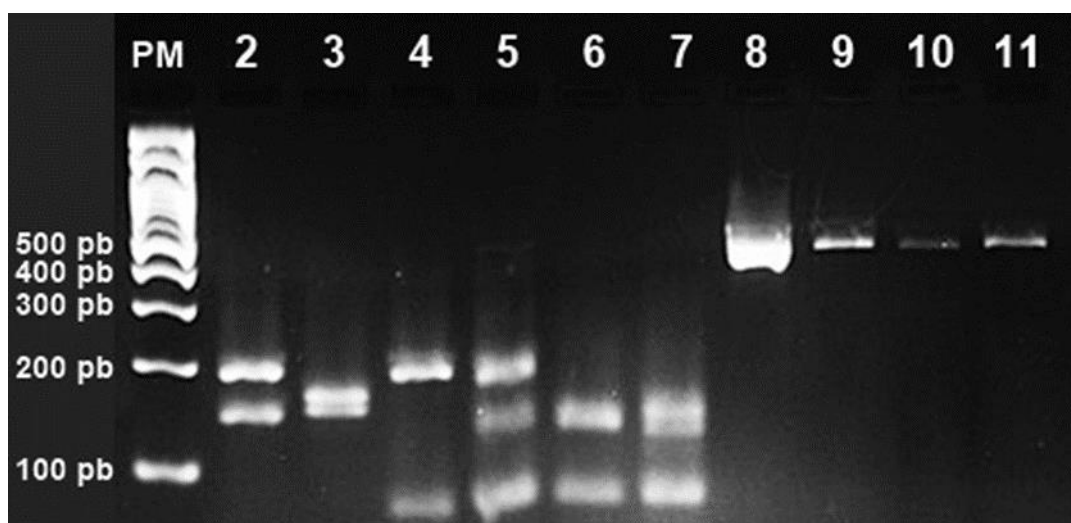
<b>Espécie</b>	<b>Local</b>	<b>NF</b>	<b>TM</b>
<i>Bi. flaviscutellata</i>	Solo	9	11,10%
<i>Sc. nematoducta</i>	Solo	3	33,30%
<i>Sc. nematoducta</i>	Dossel	3	33,30%
<i>Py. amazonensis</i>	Dossel	7	14,20%
<i>Lu. gomezi</i>	Solo	5	20%
<i>Ny. anduzei</i>	Borda	9	11,10%

NF = número de fêmeas analisadas

TM = taxa mínima de infecção

Após este procedimento, foi realizada a PCR-RFLP com as amostras positivas para a região ITS1. Três amostras amplificaram fragmentos de DNA, com bandas de aproximadamente de 500pb, o que correspondeu com o controle positivo da espécie *Endotrypanum*, sendo esses os pools 9 - *Ny. anduzei*, 10 – *Py. amazonensis*, 11 – *Lu. gomezi*. A amostra 5 – *Bi. flaviscutellata* amplificou em dois fragmentos, na altura entre 150pb e 200pb, que correspondeu com o controle de *L. amazonensis* e as amostras 6 e 7 de *Sc. nematoducta* amplificaram fragmentos entre 150pb e 100pb, sem corresponder a uma espécie específica (Figura 18).

O sequenciamento das amostras positivas indicou que, um pool da espécie *Bi. flaviscutellata* estava infectado com *Leishmania* sp., com similaridade de 81,55% com a sequência padrão depositada no GenBank, não sendo possível alcançar o nível específico de espécie. O pool número 6, pertencente à espécie *Sc. nematoducta*, estava infectado com parasitos do gênero *Trypanossoma* com similaridade de 85% com a sequência padrão (Tabela 6).



**Figura 18.** Resultados da PCR-RFLP mostrando fragmentos amplificados para região ITS1. Canaletas: 1: Peso molecular de 100pb; 2: *L. amazonensis*; 3: *L. braziliensis*; 4: *L. infantum*; 5: *Bi. flaviscutellata*; 6 e 7: *Sc. nematoducta*; 8: *Endotrypanum*; 9: *Ny. anduzei*; 10: *Py. amazonensis*; 11: *Lu. gomezi*.

Os pools 9, 10 e 11 correspondentes as espécies de flebotomíneos, *Ny. anduzei*, *Py. amazonensis* e *Lu. gomezi* foram identificadas como *Leishmania naiffi* obtendo percentual de similaridade de 96%, 86% e 83%. O pool número 7, correspondente a espécie *Sc. nematoducta* não obteve sequência de DNA compatível com nenhuma das sequências padrões (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultado do sequenciamento das amostras positivas para região intergênica (ITS1) de flebotomíneos coletados com armadilhas HP nos meses de junho, julho, novembro e dezembro no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, 2016.

Amostra	Espécie	Local	ID	ID%
28	<i>Bi. flaviscutellata</i>	SOLO	<i>Leishmania</i> sp.	81,55%
38	<i>Sc. nematoducta</i>	SOLO	<i>Trypanossoma</i> sp.	85,71%
69	<i>Ps. amazonensis</i>	DOSSEL	<i>Leishmania naiffi</i>	96,41%
122	<i>Lu. gomezi</i>	SOLO	<i>L. naiffi</i>	86,58%
314	<i>Ny. anduzei</i>	BORDA	<i>L. naiffi</i>	83,57%

Quanto ao ambiente do qual são oriundas as amostras positivas (Figura 19), os *pools* das espécies *Bi. flaviscutellata*, *Sc. nematoducta* e *Lu. gomezi* foram obtidos no ambiente de solo. No ambiente de dossel foi positivo o *pool* de *Ps. amazonensis*, e no ambiente de borda foi observado um *pool* positivo de *Ny. anduzei*.



**Figura 19.** Mapa do assentamento rural de Rio Pardo (D) demonstrando os pontos de coleta onde foram capturados os flebotomíneos naturalmente infectados.

## 6. DISCUSSÃO:

### 6.1 Abundância e Diversidade Geral de Flebotomíneos:

A região amazônica possui a maior diversidade de flebotomíneos, concentrada principalmente em florestas de terra firme (BARRET et al., 1996; SILVA et al., 2014). No Estado do Amazonas são encontrados aproximadamente 50% do total de espécies registradas no país (GALATI, 2018). Neste estudo, realizado no município de Presidente Figueiredo foram obtidas 52 espécies de flebotomíneos, o que corresponde a aproximadamente 37% do total de espécies registradas no estado do Amazonas. Em outro estudo, realizado na mesma localidade, RAMOS et al. (2014), também obtiveram um total de 52 espécies de flebotomíneos, com uma diferença de 5 espécies, que não foram coletadas em nosso estudo.

Outros trabalhos, realizados em diferentes municípios do Amazonas, também demonstraram resultados similares aos nossos, por exemplo, ARIAS e FREITAS (1982) coletaram 50 espécies na Reserva Ducke em Manaus, 27 em comum conosco. FÉ et al., (1998) que coletaram 37 espécies, 23 em comum, no município de São Gabriel da Cachoeira. BARRETT *et al.* (1996) coletaram 51 espécies, 29 em comum, no município de Tefé. FIGUEIRA *et al.*, (2013) obtiveram 26 espécies no município de Lábrea, 15 em comum. Estes resultados, em comparação com os obtidos neste estudo, indicam que a fauna de flebotomíneos no município de Presidente Figueiredo é tão rica e diversificada quanto de outros municípios do Amazonas.

De modo geral, os subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus* foram os mais abundantes em nosso estudo, corroborando outros trabalhos realizados na região Norte, onde foi observado que as espécies destes subgêneros foram as mais frequentes (DIAS-LIMA et al., 2002; FREITAS et al., 2008; AZEVEDO et al., 2008; GIL et al., 2003). Estes subgêneros são de particular importância médica pois apresentam grande parte das espécies consideradas como vetores de leishmanioses nesta região.

No subgênero *Nyssomyia*, a espécie *Ny. umbratillis* foi a mais abundante do estudo, sendo capturada em todos os ambientes estudados, seguida de *Ny. anduzei* e *Ny. antunesi*. Estas espécies têm sido observadas em abundância em outros estudos realizados no Estado, como por ARIAS e FREITAS (1982) na Reserva Ducke em Manaus, onde essas espécies foram predominantes, somando 70% do total de indivíduos coletados. A espécie *Ny. antunesi* foi a mais abundante no estudo de RAMOS et al., (2014) em Presidente Figueiredo e de CASTELLON et al., (1994) na rodovia Manaus-Humaitá.

No subgênero *Psychodopygus* a espécie *Ps. amazonensis* foi a mais frequente, seguida de *Ps. clautrei* e *Ps. davisi*. Estas espécies ocorreram em proporções similares nos ambientes de solo e dossel e foram mais frequentes no ambiente de floresta em comparação com os demais. ARIAS e FREITAS (1982) coletaram estas espécies com maior frequência a 1m do solo, enquanto DIAS-LIMA et al., (2003) coletou essas espécies e outras do subgênero em maior frequência a partir de 10m do solo. As

espécies do subgênero *Psychodopygus* são conhecidamente antropofílicas, sendo frequentemente coletadas em armadilhas com isca humana ou animal, como demonstra os trabalhos de ARIAS e FREITAS (1977) e de GIL et al., (2003). Estas espécies também ocorreram com maior frequência no ambiente de floresta nos estudos de FÉ et al., (1996), CASTELLON et al., (2000) no Amazonas, e AZEVEDO et al., (2002) no Acre.

## 6.2 Aspectos Ecológicos de Flebotomíneos em Estratificação Vertical:

Neste estudo, a abundância e riqueza de flebotomíneos foram maiores ao nível de base de árvore do que de dossel, no entanto, não foi observada diferença significativa entre os estratos, indicando que a maioria das espécies transitam ambos os ambientes. Ao todo, 33 espécies foram comuns em ambos os estratos. Segundo ARIAS e FREITAS (1982) os flebotomíneos da região amazônica tem preferência pelo dossel das árvores, onde encontraram a maior abundância e riqueza de espécies na Reserva Ducke em Manaus, mesmo fato observado pelo estudo de DIAS-LIMA et al., (2004) em que diversidade de flebotomíneos foi crescente ao nível de dossel. Estes resultados diferem dos encontrados por nós em Presidente Figueiredo e por CASTELLON et al., (2000) onde a maior abundância e riqueza foram observadas ao nível do solo.

Segundo CHANIOTIS et al., (1971) as diferenças na estratificação vertical dos flebotomíneos pode ser explicada como uma resposta as mudanças físicas e biológicas do ambiente, como umidade relativa, temperatura, intensidade de luz e até mesmo fontes de repasto, assim, algumas espécies de flebotomíneos podem ser encontradas com maior facilidade durante o dia repousando em troncos de árvores ou alimentando-se em roedores terrestres e, durante o entardecer, voltam a subir para o dossel onde a noite, podem alimentar-se em preguiças e tamanduás.

Nestes estratos a espécie *Ny. umbratillis*, foi a mais frequente, seguida de *Ny anduzei*, corroborando os achados ARIAS e FREITAS (1982); DIAS-LIMA et al., (2003) e FEITOSA e CASTELLON (2004) que observaram a predominância destas espécies em diferentes altitudes em estratificação vertical. Estas espécies possuem hábitos hematofágicos similares, alimentando-se na preguiça *Choloepus didactylus*, presente geralmente no dossel, e no arborícola *Tamandua tetradactyla* (LAINSON 1983, READY et al. 1986). Nas primeiras horas da manhã, o aquecimento da copa das árvores pressiona os flebotomos a descerem ao nível do solo para protegerem-se da dessecação (DIAS-LIMA et al., 2002). Nesse momento a espécie *Ny. umbratillis* torna-se mais abundante na base de árvores que possuem raízes tabulares e rugosidade em suas cascas, assim, podendo ser capturada com maior frequência (CABANILLAS e CASTELLÓN, 1999). Está espécie também alimenta -se no marsupial *Didelphis marsupialis* encontrado no solo e associado com áreas sob ação antrópica, o que também pode explicar a presença dessa espécie no solo e sua dispersão nos ambientes (GUERRA et al. 2007).

Outras espécies, tais como, *Sc. Nematoducta*, *Bi. flaviscutellata*, *Bi. olmeca*, *Bi. reducta* e *Mi. rorotaensis* foram capturadas em maior abundância no solo,

corroborando os resultados de DIAS-LIMA et al., (2002). A maior frequência de *Sc. nematoducta* e *Mi. rorotaensis* a nível do solo, pode estar relacionado a possíveis fontes de repasto, como reptéis e anfíbios (LAINSON e SHAW, 1989;). ARIAS E FREITAS (1982) observou que *Mi. rorotaensis* foi consideravelmente mais abundante a nível do solo na região de Manaus

A espécie *Bi. flaviscutellata*, assim como *Bi. olmeca nociva*, tem sido encontrada mais frequentemente no nível do solo até aproximadamente 5m da base das árvores. (CASTELLÓN et al., 2000; DIAS-LIMA et al., 2002; SILVA et al., 2010). A presença frequente desta espécie e de *Bi. olmeca nociva*, vetores de *L. amazonensis* ao nível do solo, tem uma relação direta com sua associação por roedores silvestres (LAINSON, 1973). Segundo READY et al., (1986) flebotomos que habitam ao nível do solo, também podem ser vetores ocasionais de *Leishmania spp.* aos mamíferos, incluindo-se o homem pois, no período noturno, há a possibilidade de alimentação em animais como tamanduás ou preguiças que descem ao nível do solo para alimentar-se.

A diversidade também foi maior ao nível de base de árvore, indicando que a composição entre os ambientes é diferente e corroborando CASTELLON et al., (2000) em que a maior diversidade foi observada a nível de base de árvore e RESADORE et al., (2018) também observou maior diversidade no nível do solo em estudo realizado em Rondônia.

### **6.3 Aspectos Ecológicos de Flebotomíneos em Estratificação Horizontal:**

A abundância nos ambientes da estratificação horizontal foi maior na floresta, seguida de borda e peridomicílio. Os ambientes ainda demonstraram diferença significativa em relação a abundância entre floresta/borda e floresta/peridomicílio. FEITOSA e CASTELLON (2009) observaram uma diminuição significativa da fauna de flebotomíneos à medida que aumentava a distância do ambiente de mata em Santarém, no Pará, os autores também observaram que algumas espécies com um possível grau de adaptação ao ambiente antrópico mantiveram um número relevante próximo ao peridomicílio como *Lu. longipalpis* e *Lu. carmelinoi*. Diferente destes achados, RAMOS et al., (2014) observaram maior abundância de flebotomíneos no peridomicílio, com diferença significativa entre os ambientes.

A riqueza de espécies também foi maior na floresta seguida de borda e peridomicílio, respectivamente. No entanto não foi observada diferença significativa entre os ambientes, uma vez que grande parte das espécies capturadas na floresta, também estiveram presentes nos demais ambientes, em proporções distintas. RAMOS et al., (2014) também obtiveram o mesmo resultado em estudo realizado em Presidente Figueiredo. Os autores não encontraram diferença significativa entre os ambientes supracitados. Estes achados podem indicar uma ligeira adaptação de espécies a ambientes modificados.



A diversidade e equitabilidade foram maiores no ambiente de borda, seguido do ambiente de floresta e peridomicílio. Este resultado pode ser explicado pelo fato deste ambiente ser uma área de transição entre o ambiente florestal e o ambiente antropizado, onde animais silvestres e diversos tipos de artrópodes vão à procura de novas fontes de alimento e/ou abrigo. Embora seja menos densa, a borda da floresta possui características semelhantes ao ambiente florestal, o que torna favorável o estabelecimento de algumas populações de vetores e animais nesta região. FIGUEIRA et al., (2013) e CHAGAS et al., (2018) em seus respectivos estudos, também encontraram maior diversidade e equitabilidade de flebotomíneos no ambiente de borda. RAMOS et al., (2014) observaram que nos ambientes com o mesmo padrão de cobertura vegetal, possuem uma fauna flebotômica ocorrendo simultaneamente, com pequenas variações. Similar a estes achados, nossos resultados indicaram que os ambientes de floresta e borda obtiveram maior similaridade na composição de espécies, compartilhando 36 espécies.

Na floresta as espécies *Ny. umbratillis* e *Ny. anduzei* foram as mais abundantes, também sendo capturadas em quantidade significativa nos demais ambientes estudados, no entanto, o IndVal, demonstrou que essas espécies têm forte associação com o ambiente de floresta. Resultado similar ao encontrado por BARBOSA et al., (2008) em uma comunidade rural próximo a Manaus, onde estas espécies foram as mais abundantes, principalmente no ambiente de floresta. FEITOSA e CASTELLON (2004) também observaram que *Ny. umbratillis* foi mais abundante no ambiente de floresta, diminuindo sua frequência quando próximo aos domicílios, em duas áreas de floresta residual próximo conjuntos residenciais em Manaus, no entanto, os autores também destacaram que a presença desta e de outras espécies vetoras ou suspeitas no intra e peridomicílio, mesmo que em pequenas quantidades seriam um indicativo de adaptação ao ambiente sob ação antrópica, assim, aumentando o risco de ocorrência de leishmaniose nesta localidade.

O IndVal indicou ainda, as espécies *Ny. yulli yulli*, *Bi. reducta* e *Mi. rorotaensis* com maior associação com o ambiente de floresta. Estudos realizados na região, tem demonstrado que essas espécies são as mais abundantes nesse tipo de ambiente, mas também podem ser coletados em ambientes modificados (DIAS-LIMA, 2002; CASTELLÓN et al., 2000; REIS et al., 2013). A espécie *Mi. rorotaensis* foi mais abundante no ambiente de floresta, mas também foi capturada, em menor abundância, nos demais ambientes estudados. Esta espécie, assim como outras espécies do subgênero, são suspeitas de serem vetores de tripanossomatídeos de répteis. *Mi. rorotaensis*, inclusive, foi encontrado com infecção natural infectado por *Trypanosoma thecadactyli* no estudo realizado por LAINSON e SHAW (1979) na região do rio Jari, no Pará.

As espécies *Ny. yulli yulli*, *Pa. cuzquena* e *Bi. reducta* não foram abundantes comparadas a outras espécies. A maior abundância de indivíduos dessas espécies no ambiente florestal pode representar uma especificidade dessas espécies por esse ambiente. Outra possibilidade está relacionada ao método de coleta. Algumas espécies possuem baixa atratividade à armadilha luminosa, e de modo geral, essas espécies são relatadas com baixa abundância nos estudos entomológicos com o uso de armadilha luminosa

O ambiente de peridomicílio apresentou o maior valor de dominância e a espécie predominante neste ambiente foi *Ny. antunesi*. Esta espécie também foi a única associada a este ambiente no Indval, com 54% de indicação e o valor de  $p < 0,05$ , indicando que esta espécie pode ser considerada um bioindicador de sinantropização. A presença desta espécie no peridomicílio está associada principalmente a proximidade de abrigos de animais, como porcos e galinhas, como demonstra o estudo de RAMOS et al., (2014) em que esta espécie foi a mais frequente nestes ambientes. PEREIRA-JUNIOR et al., também observaram essa espécie em abundância em áreas com maior grau de ação antrópica em Rondônia e demonstraram a presença de DNA humano nesta espécie, indicando a realização de repasto, o que pode aumentar o risco de transmissão em áreas endêmicas para leishmaniose (PEREIRA-JUNIOR et al., 2019).

#### 6.4 Abundância e Diversidade de Espécies Vektoras:

Neste estudo, foram coletadas 11 espécies de flebotomíneos incriminadas ou suspeitos como vetores de LT no Brasil: *Bi. flaviscutellata*, *Bi. olmeca nociva*, *Lu. gomezi*, *Ny. anduzei*, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratillis*, *Ps. amazonensis*, *Ps. carreirai carreirai*, *Ps. davisi*, *Ps. hirsutus hirsutus* e *Ps. squamiventris squamiventris*.

De um modo geral, destacou-se a espécie *Ny. umbratillis*, como a mais abundante do estudo, sendo capturada em todos os ambientes. Esta espécie possui grande importância epidemiológica, principalmente no Estado do Amazonas, onde é o principal vetor de *L. guyanensis*, agente causador da LT. Sua distribuição neste estudo está de acordo com os trabalhos realizados por ARIAS e FREITAS, (1982) FREITAS et al., (2002); FEITOSA e CASTELLÓN, (2004); PESSOA et al., (2007); BARBOSA et al., (2008) e DIAS-LIMA et al., (2002) que tem encontrado essa espécie em abundância no ambiente florestal, mas também em áreas periurbanas, associada a surtos de LT.

No Amazonas, a maioria parte dos casos de LT derivam de regiões rurais e próximas de florestas, onde os infectados tiveram contato com o vetor em seu ambiente natural. No entanto, a presença de *Ny. umbratillis* no ambiente de peridomicílio de áreas periféricas e a ocorrência de casos da doença em crianças e idosos sugere a instalação de um ciclo periurbano da doença, como tem sido observado em algumas áreas de peridomicílio em comunidades rurais e periurbanas (PAES, 1991; FEITOSA E CASTELLÓN, 2004; GUERRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008).

A espécie *Bi. flaviscutellata* foi a quinta mais frequente em todo o estudo, estando presente principalmente no ambiente de solo, mas sendo capturada também nos demais ambientes. Esta espécie é encontrada principalmente em florestas de terra firme e igapós, e tem demonstrado boa adaptação a plantações de Pinus e Gmelina. Alimentam-se do sangue de roedores e marsupiais, como *Proechimys sp.* e *Oryzomys sp.*, encontrados ao nível do solo, naturalmente infectados com *Leishmania* (ARIAS e FREITAS, 1982; LAINSON e SHAW, 1968; DIAS-LIMA et al., 2002). Essa espécie foi incriminada por LAINSON e SHAW (1968) como principal vetor de *L.*

*amazonensis*, agente causador de leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa e de casos da forma mucocutânea (COELHO et al.,2011; GUERRA et al.,2015).

No Amazonas, GUERRA et al., (2006) e BARBOSA et al., (2008) apontaram a presença de *Bi. flaviscutellata* e de *Bi. olmeca nociva*, considerada vetor secundário de *L. amazonensis*, no peridomicílio de comunidades rurais, indicando potencial risco de transmissão de leishmaniose. VILELA et al., (2011) também notou maior frequência deste vetor próximo ao peridomicílio de áreas urbanas e rurais no Estado do Tocantins, em uma área endêmica de leishmaniose.

A espécie *Ny. antunesi* foi a mais abundante no ambiente de peridomicílio. Estudos em áreas antropizadas revelaram a presença dessa espécie, especialmente em abrigos de animais domésticos sendo observado um elevado grau de adaptação a ambientes fragmentados (SILVEIRA et al., 1991; RANGEL e LAISON, 2009; RAMOS et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2017 ). Esta espécie é incriminada como vetor de *L. lindenbergi* agente causador de leishmaniose tegumentar no Pará e já foi encontrada infectada com DNA de *Leishmania* sp. em Rondônia e na Colômbia (SILVEIRA et al., 2002; TRUJILLO et al. 2013, OGAWA et al. 2016).

A espécie *Ps. davisii*, foi a sétima mais abundante de todo o estudo, sendo mais frequente no solo e no ambiente de floresta. Nos estudos de FEITOSA e CASTELLÓN (2004) essa espécie foi a mais frequente nas capturas na altura do solo, enquanto Dias-LIMA et al., (2002) e CASTELLÓN et al., (2000) capturaram essa espécie a partir de 6m do solo da floresta. Essa espécie foi já encontrada infectada por flagelados na floresta Utinga, em Belém, estado do Pará (SHAW e LAINSON 1972). Três isolados de *Ps. davisii* coletados em Rondônia foram identificados como *L. braziliensis* (GRIMALDI et al. 1991). GIL et al., (2003) identificou a presença de *L. naiffi* em *Ps. davisii*, através de um painel de anticorpos monoclonais. Esta espécie também já foi encontrada infectada com DNA de *Leishmania* nos municípios de Lábrea e Tefé (PEREIRA-JUNIOR et al., 2017; SILVA et al., 2014).

A espécie *Lu. gomezi* tem sido associado à transmissão de *L. (V.) panamensis* em alguns países da América do Sul e no norte do Brasil, recentemente, uma infecção natural por *L. shawi* foi encontrada em *Lu. gomezi* capturado na floresta no estado do Pará. Segundo CHRISTENSEN et al. (1983) no Panamá e YOUNG e ROGERS (1984) no Equador, a *Lu. gomezi* também é capaz de transmitir *L. braziliensis*.

Das espécies consideradas vetores secundários ou putativos de LT temos a espécie *Ny. anduzei* vetor secundário de *L. guyanensis* (LAINSON, 1979). Esta espécie também já foi encontrada infectada por *Endotrypanum* sp. (GRIMALDI et al., 1991). A espécie *Bi. olmeca nociva* já foi encontrada naturalmente infectada com *L. amazonensis* em coletas realizadas na área periurbana de Manaus e é considerada vetor secundário na transmissão desta *Leishmania* no Estado do Amazonas (ARIAS et al., 1987).

O gênero *Psychodopygus* apresentou maior número de espécies suspeitas de atuarem como vetores de *Leishmania*. a espécie *Ps. squamiventris squamiventris* é referida como transmissora de *L. naiffi*, a espécie *Ps. hirsutus hirsutus* já foi encontrada infectada por *L. braziliensis* no Estado de Minas Gerais (RANGEL et al., 1985), e com *L. naiffi* nos estados de RO e PA (GIL et al., 2003, SOUZA et al., 2016). LE PONT et

al., (1992) isolaram *L. braziliensis* de *Ps. carreirai carreirai*, de uma cepa que tinha sido isolada de humanos, na Bolívia. A espécie *Ps. amazonensis* tem sido referida como transmissora de *L. braziliensis* no Estado do Pará e já foi encontrada infectada com essa mesma espécie no Estado de Rondônia (RANGEL e LAINSON, 2009; RESADORE et al., 2018).

## 6.5 Infecção Natural por *Leishmania* em Flebotomíneos:

A taxa de infecção mínima (TM) encontrada neste trabalho (1.15%) foi relativamente similar a outros estudos realizados nos municípios do Amazonas. SILVA et al., (2014) encontraram uma TM de 0,84% de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos no município de Lábrea. PEREIRA-JUNIOR (2014) obteve uma taxa de 0,83% no município de Tefé. CHAGAS et al., (2018) encontrou uma TM entre 2.7% e 6.2% de *Leishmania* em flebotomíneos de um assentamento rural no Amazonas.

No estudo foi observado o primeiro relato de infecções por *L. naiffi* em fêmeas de *Lu. gomezi*, *Ny. anduzei* e *Ps. amazonensis*. Essas espécies já possuem associação com a visualização de flagelados ou detecção de DNA de *Leishmania* (LAINSON, 2010).

A espécie *Bi. flaviscutellata* também foi detectada com DNA de *Leishmania*, porém não foi possível a identificação a nível específico. A detecção de *Leishmania* nessa espécie de flebotomíneo é importante, visto que essa espécie é associada a transmissão de espécies de *L. amazonensis*, como já foi descrito anteriormente. Esta espécie também já foi encontrada infectada com *L. guyanensis* por FOUQUE et al., (2007) na Guiana Francesa.

Na espécie *Sc. nematoducta* foi detectado DNA de *Trypanosoma sp.*, sendo este o primeiro registro de infecção desta espécie no Brasil e no Estado do Amazonas. Outras espécies do gênero *Sciopemyia* já foram encontradas infectadas por tripanossomatídeos e por *Leishmania* (CARVALHO et al., 2016; SILVA et al., 2014; PEREIRA-FILHO et al., 2018). Espécies desse subgênero não são antropofílicas, e se alimentam de anfíbios e animais de sangue frio, com baixa possibilidade de alimentar-se em animais de sangue quente (SILVA et al., 2014; ÁVILA et al., 2018). Algumas espécies desse gênero são incriminadas como vetores de tripanossomatídeos de sapos e rãs na Amazônia, e nas últimas décadas, diversos estudos têm esses flebotomíneos infectados com trypanossomas An03, um clado de trypanossomas que ocorre exclusivamente na Amazônia e infecta sapos e rãs (RYAN et al., 1987; GIL et al., 2003; SOUZA et al., 2016; SILVEIRA et al. 1991; FERREIRA et al., 2008).

Nas espécies *Lu. gomezi*, *Ny. anduzei* e *Ps. amazonensis* foram encontradas DNA de *L. naiffi*. A espécie *Ny. anduzei*, recentemente, foi encontrada infectada por SOUZA et al., (2017) com essa *L. naiffi* no Estado do Amapá. Nas espécies *Lu. gomezi* e *Ps. amazonensis* este é o primeiro registro de infecção por *L. naiffi*, e o primeiro registro dessas espécies encontradas infectadas no Estado do Amazonas. *L. naiffi* é encontrado infectando o tatu *Dasypus novemcinctus* e tem como principais vetores

flebotomíneos do gênero *Psychodopygus* (LAINSON, 1989). Casos de LT por esse parasita já foram registrados na região amazônica e na Guiana. Casos de LT por *L. naiffi* tem sido observado principalmente no Estado do Pará, mas é provável que sua distribuição seja mais ampla e que os casos de leishmaniose por esse parasito sejam subnotificados. (BRAZIL et al., 2015; LAINSON, 2010; GIL et al., 2003; SOUZA et al., 2017).

## 7. CONCLUSÃO:

No presente estudo foi observado que o assentamento rural Rio Pardo possui uma fauna de flebotomíneos rica e diversa mesmo em ambientes com maior nível de antropização.

Os ambientes de solo e dossel não apresentaram diferença estatística na composição de espécies, demonstrando que as populações de flebotomíneos frequentam ambos os ambientes e podem estar se alimentando em diferentes tipos de animais presentes nesses estratos, indicando um potencial risco de infecção por diferentes tipos patógenos.

No ambiente de borda de floresta foi observada a maior diversidade e equitabilidade, também foi observada maior similaridade com o ambiente de floresta, indicando que algumas espécies de flebotomíneos podem estar encontrando condições mais favoráveis de sobrevivência nessa área.

A espécie *Ny. umbratilis* foi a mais abundante no estudo, sendo capturada em todos os ambientes, com maior frequência na floresta e no solo, corroborando com os dados disponíveis na literatura sobre essa espécie e com a sua participação no ciclo de transmissão da LT no Amazonas. No entanto, a presença frequente desta espécie e de outras do gênero *Nyssomyia*, consideradas vetores de LT, no peridomicílio pode potencializar o risco de transmissão da doença.

A espécie *Ny. antunesi* foi a mais abundante no ambiente de peridomicílio, também corroborando com os achados de outros estudos, que associam essa espécie principalmente a ambientes antropizados, reforçando a necessidade de vigilância entomológica no local, uma vez que essa espécie é considerada antropofílica e está associada a transmissão de LT em outros estados da região norte.

A espécie *Sc. nematoducta* foi encontrada, pela primeira vez infectada com *Trypanossoma sp.*, corroborando com os outros resultados disponíveis na literatura em que outras espécies do gênero também já foram encontradas infectadas com *Trypanossoma* e são suspeitas de transmitirem esses parasitos à anfíbios na Amazônia. Esse achado é importante pois aumenta o conhecimento sobre a diversidade de patógenos que esses insetos podem ser vetores e sobre os hábitos alimentares de espécies de flebotomíneos pouco estudadas na região.

O encontro de espécies suspeitas como vetores de LT infectadas com *L. naiffi* indica que estas espécies possam vir a desempenhar um papel importante na

transmissão deste parasito, uma vez que os casos de LT por *L. naiffi* são, geralmente, subclínicos e podem estar sendo subnotificados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVES, G. B., OSHIRO, E. T., LEITE, M. C., MELÃO, A. V. et al. (2012). Phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae) at rural settlements in the municipality of Cáceres, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(4), 437-443. Epub July 26, 2012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012005000010>
- ALVES, V. R.; FREITAS, R. A.; SANTOS, F. L.; OLIVEIRA, A. F. J.; BARRET, T. V.; SHIMABUKURO, P. H. F. (2012). Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the Amazonas state, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(2): 220-227.
- ARAGÃO, H. B. (1922) Transmissão da leishmaniose no Brasil, pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil méd.*, Rio de Janeiro, 36:129-30.
- ARAUJO-PEREIRA, T, FUZARI, A. A, ANDRADE FILHO J. D, PITA-PEREIRA D, et al. (2014). Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in na área of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Parasites & Vectors* 7: 360. doi: 10.1186/1756-3305-7-360
- ARIAS, J. R, FREITAS, R. A, R. D. NAIFF, T. V BARRETT. (1987). Observations on the parasite *Leishmania mexicana amazonensis* and its natural infection of the sand fly *Lutzomyia olmeca nociva*. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 21. 48-54.
- ARIAS, J. R., & FREITAS, R. A. de. (1977). On the Vectors of Cutaneous Leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. I. Preliminary Findings. *Acta Amazonica*, 7(2), 293-294. <https://dx.doi.org/10.1590/1809-43921977072293>
- ARIAS, J. R., & NAIFF, R. D. (1981). The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76(3), 279-286. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761981000300005>
- ARIAS, J. R.; FREITAS, R. A. (1978). Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2. incidência de flagelados em flebotomos selváticos. *Acta Amazonica*, v. 8, n. 3, p. 387–396, 1978.
- ÁVILA, M. M., BRILHANTE, A. F., GALATI, E. A. B. CARDOSO A S., BRAZIL, R. P (2018). *Sciopemyia vattierae* (Le Pont & Desjeux, 1992) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): new record from Acre state, Brazil. *Check List*. 14. 585-589. 10.15560/14.4.585.
- AZEVEDO, A.C. R, COSTA, S. M, PINTO, M.C.G, SOUZA, J. L. et al. (2008). Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 760-766. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000800003>
- BARATA, R. A., PAZ, G. F., BASTOS, M. C., ANDRADE, R. C. O, et al. (2011). Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 136-139. Epub March 18, 2011. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000003>

BARBOSA, M. G. V., FÉ, N. F., MARCIÃO, A. H. R., SILVA, A. P. T., et al., (2008). Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5), 485-491. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500010>

BARKER, D.C. (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis, *Parasitology Today*, Volume 3, Issue 6, Pages 177-184, ISSN 0169-4758, [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90174-8).

BARRETT, T. V., FREITAS, R. A., ALBUQUERQUE, M. I. C., GUERRERO, J. C. H. (1996). Report on a collection of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from the middle Solimões (Amazonas, Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1), 27-35. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000100005>

BARRETT, T.V., SENRA, M.S., (1989) Leishmaniasis in Manaus, Brazil, *Parasitology Today*, v.5.(8). p. 255-257, ISSN 0169-4758, [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90258-5).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis Janeiro de 2019. Leishmaniose Tegumentar 2017 – Boletim epidemiológico. Disponível em: [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo layout.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo%20layout.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189p. <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>

BRAZIL, R. P., RODRIGUES, F.A.A., FILHO, J. A (2015). Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*. 4.

BRAZIL, R.P., BRAZIL, B.G. (2018) Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_5)

CABANILLAS, M. R. S. & CASTELLON, E. G., (1999). Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94:289-296.

CABLE, J., BARBER, I., BOAG, B., ELLISON, A. R., et al., (2017). Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 372(1719), 20160088. doi:10.1098/rstb.2016.0088



CAMARA COELHO, L.I., PAES, M., GUERRA, J.A.O. et al. (2011). Parasitol Res 108: 671. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2139-9>

CAMERON, M. M., PESSOA, F. A., VASCONCELOS, A. W. and WARD, R. D. (1995), Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. Medical and Veterinary Entomology, 9: 263-272. doi:10.1111/j.1365-2915.1995.tb00132.x

CAMPBELL-LENDRUM, D., MANGA, L., BAGAYOKO, M., & SOMMERFELD, J. (2015). Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 370(1665), 20130552. doi:10.1098/rstb.2013.0552

CARVALHO, G. M, BRAZIL, R. P, RÊGO, F. D, RAMOS, M. C. et al. (2017). Molecular detection of Leishmania DNA in wild-caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cave in the state of Minas Gerais, Brazil. Journal of Medical Entomology 54 (1): 196–203. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw137>

CASTELLÓN, E. G. B.; FÉ, N. F.; BUHRNHEIM, P. F.; FÉ, A. F. (2000). Flebotomíneos na Amazônia. II. Listagem das espécies coletadas na bacia petrolífera no rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. Revista Brasileira de Zoologia, 17(2): 455-462.

CASTELLÓN, E. G., ARIAS, J. R., FREITAS, R. A., NAIFF, R. D. (1994). OS FLEBOTOMÍNEOS DA REGIÃO AMAZÔNICA, ESTRADA MANAUS - HUMAITA, ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL (DÍPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE). Acta Amazonica, 24(1-2), 91-102. <https://dx.doi.org/10.1590/1809-43921994242102>

CHAGAS, E., SILVA, A. S., FÉ, N. F., FERREIRA, L. S., SAMPAIO, V. S., et al., (2018). Composition of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) and detection of Leishmania DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in different ecotopes from a rural settlement in the central Amazon, Brazil. Parasites & vectors, 11(1), 180. doi:10.1186/s13071-018-2743-6

CHANLOTIS, B. N.; NEELY, J. M.; CORREA, M. A.; TESH, R. B. & JOHNSON, K. M., (1971). Natural population dynamics of Phlebotomine sandflies in Panama. Journal of Medical Entomology, 8:339- 352.

CHRISTENSEN, H.A., G.B. FAIRCHILD, A. HERRERA, K.M. JOHNSON, D.G. YOUNG & A.M. VASQUEZ. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the republic of Panama. J. Med. Entomol. 20: 463-484.

COSTA, W.A., SOUZA, N.A. (2018) Sand Flies: Medical Importance. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_1)

DA SILVA, P. E. S., FREITAS, R. A., SILVA, D. F., & ALENCAR, R. B. (2010). Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 43(1), 78-81. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000100017>

DE AGUIAR, G.M., VIEIRA, V.R. (2018) Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_4)

DE SOUZA, A., DA ROCHA B. I., DAS GRAÇAS S. S. M., LIMA, J. et al. (2017). Natural Leishmania (Viannia) infections of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) indicate classical and alternative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis in the Guiana Shield, Brazil. L'infection naturelle de phlébotomes (Diptera, Psychodidae) par Leishmania (Viannia) révèle l'existence de cycles classique et alternatif de transmission de la leishmaniose cutanée sur le plateau des Guyanes au Brésil. *Parasite* (Paris, France), 24, 13. doi:10.1051/parasite/2017016

DIAS-LIMA, A. G.; CASTELLÓN, E. G.; MEDEIROS, J. F.; SHELLOCK, I. (2002). Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(3): 823-832.

DIAS-LIMA, A. G.; CASTELLÓN, E. G.; SHELLOCK, I. (2003). 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.

DOS SANTOS, T. V., PRÉVOT, G., GINOUVÈS, M., DUARTE, R., et al. (2018). Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) and the transmission of American cutaneous leishmaniasis agents in an Amazonian/ Guianan bordering area. *Parasites & vectors*, 11(1), 612. doi:10.1186/s13071-018-3190-0

EL TAI, N. O., OSMAN, O. F., EL FARI, M., PRESBER, W., and SCHONIAN, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 575–579.

FÉ, N. F.; FREITAS, R. A.; BARETT, T. V. (1998). Phlebotomine sand flies from São Gabriel da Cachoeira (State of Amazonas, Brazil) with a description of *Lutzomyia* (*Psychoopygus*) *douradoi* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(3): 331-336.

FEITOSA M.A.C, CASTELLÓN E.G. (2004). Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil: II. Estratificação horizontal. *Acta Amaz.* 34:121–7.

FEITOSA, M. A. C.; CASTELLÓN, E. G. (2006). Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 4, p. 539–548.

FIGUEIRA, E. A. G., SILVA, G., CHAGAS, E.C. S., SHIMABUKURO, P. H. F. (2013). Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Lábrea, state of Amazonas, Brazil, with a description of *Evandromyia* (*Aldamyia*) *apurinan* Shimabukuro, Figueira & Silva, sp. nov. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 280-287. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762013000300004>

FOUQUE, F., GABORIT, P., ISSALY, J., CARINCI. et al. (2007). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 35-40. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000100005>

- FRANCO, A. M. R., & GRIMALDI JR, G. (1999). Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a Unique Parasite Infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 261-268. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000200026>
- FREITAS, R. A, NAIFF, R. D, & BARRETT, T. V. (2002). Species Diversity and Flagellate Infections in the Sand Fly Fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 53-59. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000100008>
- FURTADO N. V. R., GALARDO, A. K. R., GALARDO, C. D., FIRMINO. V. C., and DOS SANTOS, T. V. (2016). Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Hydroelectric System Affected Area from Northern Amazonian Brazil: Further Insights into the Effects of Environmental Changes on Vector Ecology, *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2016, Article ID 9819723, 12 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9819723>.
- GALATI E.A.B. (2018) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2)
- GIL, L. H. S.; BASANO, A. S.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S. et al. (2003). Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davis* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(6): 751-755.
- GITHEKO, A. K., LINDSAY, S. W., CONFALONIERI, U. E., & PATZ, J. A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1136–1147. PMID: 11019462
- GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. (2003). Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 71-80. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>
- GOSSAGE S. M, ROGERS M. E, BATES P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33: 1027–1034.
- GUERRA, J. A. O., MACIEL, M. G., GUERRA, M. V. F., TALHARI, A. C., et al. (2015). Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(Suppl. 1), 12-19. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0268-2013>
- GUERRA, J. A. O., PAES, M. G., COELHO, L. I. A. R., BARROS, M. L. B. et al. (2007). Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta Amazonica*, 37(1), 133-137. <https://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672007000100017>
- GUERRA, J. A. O., RIBEIRO, J. A. S., COELHO, L. I. A. R. C., BARBOSA, M. G. V., et al., (2006). Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(11), 2319-2327. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100006>

- HANDMAN E., BULLEN D. V (2002). Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332–334.
- HARRUS, S.; BANETH, G. (2005) Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 11–12, p. 1309–1318., 2005.
- HOTEZ, P., OTTESEN, E., FENWICK, A., MOLYNEUX, D. (2006). The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. In: POLLARD, A. J. & FINN, A. (eds). *Hot Topics in Infection and Immunity in Children III. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 582. Springer, Boston, MA.
- KILLICK-KENDRICK, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies, *Clinics in Dermatology*, v.17(3)., Pages 279-289, ISSN 0738-081X, [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2).
- KILPATRICK, A. M., & RANDOLPH, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet (London, England)*, 380(9857), 1946–1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)61151-9
- LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT, SOUZA AA., et al., (1994). The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- LAINSON, R. (2010). The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 2, p. 13–32.
- LAINSON, R., (1983). The American Leishmaniasis: Some observation on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77:569-596.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. (1968). Leishmaniasis in Brazil: I. observations on enzootic rodent leishmaniasis incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (mangabeira) as the vector in the lower amazonian basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3): 385-395.
- LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. (1976). Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 171-172.
- LE PONT, F.D., TORRES P. E. FOURNET, J. M., MOUCHET, J. A. (1992). *Leishmanioses et phlébotomes en Bolivie*. ORSTOM Éditions.
- LEWIS, D. J. (1971). Phlebotomid sandflies. *Bulletin of the World Health Organization*, 44(4), 535–551. PMID: 5316255
- LIMA, L. C., MARZOCHI, M. C. A., SOBROZA, P. C., SOUZA, M. A. (1988). Observações sobre a leishmaniose tegumentar, cinco anos após profilaxia. *Revista de Saúde Pública*, 22(1), 73-77. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101988000100010>

LONARDONI, M. V. C., SILVEIRA, T. G. V., ALVES, W. A., MAIA-ELKHOURY, A. N. S., et al. (2006). Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(12), 2713-2716. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001200020>

MAGURRAN, A. E. 2005. Species abundance distributions: pattern or process? *Functional ecology*, 19: 177-181.

MAROLI, M., FELICIANGELI, M. D., BICHAUD, L., CHARREL, R. N. and GRADONI, L. (2013), Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 123-147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

MARTENS, W. J. M., NIESSEN, L. W., ROTMANS, J, JETTEN, T. H, et al., (1995). Climate change and vector-borne disease: a global modeling perspective. *Global Environ Change* 5:195-209.

MARZOCHI, M. C. de A., & MARZOCHI, K. B. F. (1994). Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(Supl. 2), S359-S375. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1994000800014>

MICHALSKY, É. M., FORTES-DIAS, C. L., PIMENTA, P. F.P., SECUNDINO, N. F.C., & DIAS, E. S. (2002). Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(5), 255-259. <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000500004>

MOLYNEUX, D. H. (2003). Common themes in changing vector-borne disease scenarios, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97,(2), p. 129-132, ISSN 0035-9203, [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90097-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90097-6).

MORAN, M. (2005). A breakthrough in R&D for neglected diseases: new ways to get the drugs we need. *PLoS medicine*, 2(9), e302. doi:10.1371/journal.pmed.0020302

MORICONI, M., RUGNA, G., CALZOLARI, M., BELLINI, R., et al., (2017). Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005660. doi:10.1371/journal.pntd.0005660

NEITZKE, H. C. et al. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 1, p. 17–22, 2008.

NERY, L. C. R.; LOROSA, E. S.; FRANCO, A. M. R. 2004. Feeding preference of Sand Flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an Urban forest in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6): 571-574.

OGAWA G. M, PEREIRA-JUNIOR A. M, RESADORE F. F, FERREIRA R. G. M, et al. (2016) Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 25: 61–68.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Informe Epidemiológico das Américas, Leishmanioses, n. 7. Março de 2019. <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>

PAES, M. G. 1991. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae) em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas, 112pp.

PAIVA B. R, SECUNDINO N. F. C, PIMENTA P. F. P, GALATI E. A. B, et al. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saude Publica* 2007; 23:87–94.

PEREIRA JÚNIOR, A. M., TELES C.B.G., DE AZEVEDO S. A. P., DE SOUZA R. M., et al., (2015). Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. *Parasit Vectors.* 8:180.

PEREIRA-FILHO, A. A, FONTELES, R. S, BANDEIRA M. D. C. A, MORAES J. L. P. et al. (2018). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. *J Med Entomol.* 55(4):989–94. 10.1093/jme/tjy014

PESSOA, F. A. C., MEDEIROS, J. F., & BARRETT, T. V. (2007). Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5), 593–599. Epub July 27, 2007. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000075>

PESSÔA, S. B.; COUTINHO, J. O. (1939). Infecção natural de *Phlebotomus pessoai* por formas de leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene*, 10: 139-142

PETERS N.C., EGEN J.G., SECUNDINO N., DEBRABANT A., et al. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970–974. doi:10.1126/science.1159194.

PIMENTA, P. F, MODI, G. B, PEREIRA, S. T, SHAHABUDDIN, M., et al. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359–369.

QUEIROZ, R. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W.; PESSOA, F. A. C. et al. (1991). Phlebotomine sandfly (diptera: Psychodidae) faunal survey in an American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Parassitologia*, 33: 159-167.

RAMOS, R. W. 2012. Efeitos do desmatamento e da densidade populacional humana na abundância e diversidade de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em um assentamento rural na Amazônia Central. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 96 p.

- RAMOS, W. R., MEDEIROS, J. F., JULIÃO, G. R., RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M., et al., (2014) Anthropogenic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta Trop.* 2014; 139: 44-52.
- RANGEL E.F., LAINSON R., CARVALHO B.M., COSTA S.M., SHAW J.J. (2018) Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_7)
- RANGEL, E. F., LAINSON, R. (2009). Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 937-954. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700001>
- READY, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. & WARD, R. D., (1986). The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae) the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 76:21-40.
- REIS, S. R., GOMES, L. H. M., FERREIRA, N. M., NERY, L. R. P., et al., (2013). Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. *Acta Amazonica*, 43(1), 121-123. <https://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000100016>
- RESADORE F, PEREIRA AM, JÚNIOR, PAULO PFM. et al. (2019). Composition and vertical stratification of phlebotomine sand fly fauna and the molecular detection of *Leishmania* in forested areas in Rondônia state municipalities, Western Amazon, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*;19(5):347–357
- RIBEIRO J. M. C. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143–152.
- RIBEIRO, J. M., ROSSIGNOL P. A., SPIELMAN, A, (1986). Blood finding strategy of a capillary - feeding sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Comp Biochem Physiol* 83: 683–6.
- ROCHA, L. C.; FREITAS, R. A.; FRANCO, A. M. R. 2013. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in urban rainforest fragments, Manaus-Amazonas state, Brazil. *Acta tropica*, 126: 103-109.
- ROGERS, M. E. (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3: 223. doi: 10.3389/fmicb.2012.00223.
- SAMPAIO, V. S., SIQUEIRA, A. M., ALECRIM, M. G. C., MOURÃO, M. P. G., et al., (2015). Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(Suppl. 1), 4-11. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0275-2014>
- SECUNDINO N. F, EGER-MANGRICH, I., BRAGA E. M, SANTORO M. M. (2005). *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol* 42: 928–938.
- SERAFIM, T. D., COUTINHO-ABREU, I. V., OLIVEIRA, F., MENESES, C. et al. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis

augmenting vector infectivity. *Nature microbiology*, 3(5), 548–555. doi:10.1038/s41564-018-0125-7

SERVICE, M.W. (1991). Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. *Revista de Saúde Pública*, 25(3), 165-178. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101991000300002>

SILVA T. R. R, ASSIS M. D. G, FREIRE M. P, REGO F. D. et al. (2014) Molecular detection of *Leishmania* in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected in the Caititu Indigenous Reserve of the Municipality of Lábrea, State of Amazonas, Brazil. *J Med Entomol*. 2014;51:1276–1282. doi: 10.1603/ME14025.

SILVA, D. F.; FREITAS, R. A.; FRANCO, A. M. R. 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, Amazonas. *Neotropical Entomology*, 36(1): 138-144.

SILVEIRA, F. T., ISHIKAWA, E. A. Y., DE SOUZA, A. A., LAINSON, R. (2002). An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasitology*, 85: 43-50.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. (2004). Clinical and imunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3): 239-251.

STUART K, BRUN R, CROFT S, FAIRLAMB A, et al. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945.

TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., RODRIGUES, J. C., CREPALDI, P. H., et al. (2013). The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003594. doi:10.1371/journal.ppat.1003594

TRUJILLO A. V, REINA A. E. G, ORJUELA A. G, SUAREZ E. P, et al. (2013) Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. *Mem Inst Osw Cruz*; 108:463–469.

VILELA M.L., AZEVEDO C.G., CARVALHO B.M., RANGEL E.F. (2011) Phlebotomine Fauna (Diptera: Psychodidae) and Putative Vectors of Leishmaniasis in Impacted Area by Hydroelectric Plant, State of Tocantins, Brazil. *PLOS ONE* 6(12): e27721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027721>

VORA N. (2008). Impact of anthropogenic environmental alterations on vector-borne diseases. *Medscape journal of medicine*, 10(10), 238. PMID: PMC2605134

WALSH, J., MOLYNEUX, D., & BIRLEY, M. (1993). Deforestation: Effects on vector-borne disease. *Parasitology*, 106(S1), S55-S75. doi:10.1017/S0031182000086121

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017). Leishmaniasis. Epidemiological situation. <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

YASUOKA J, LEVINS R 2007. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 76: 450-460.



YOUNG D. G, ROGERS T. E (1984). The phlebotomine sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) of Ecuador. *J Med Entomol* 21: 597-611.

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

FERREIRA, R. C., DE SOUZA, A. A., FREITAS, R. A., CAMPANER, M., TAKATA, C. S. A., BARRETT, T. V., TEIXEIRA, M. M. G. (2008). A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(5), 427–435. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00342.x

RYAN L, LAINSON R, SHAW JJ, BRAGA RR, ISHIKAWA EA (1987b) Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. *Med Vet Entomol* 1:383–395