



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

INGRID NAZARÉ GARCIA ROSÁRIO

ASPECTOS ECOEPIDEMIOLÓGICO ASSOCIADOS À FAUNA
FLEBOTOMÍNICA DE UM FRAGMENTO FLORESTAL URBANO

BELÉM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

ASPECTOS ECOEPIDEMIOLÓGICO ASSOCIADOS À FAUNA
FLEBOTOMÍNICA DE UM FRAGMENTO FLORESTAL URBANO

INGRID NAZARÉ GARCIA ROSÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia do convênio da Universidade Federal do Pará e Embrapa Amazônia Oriental, como requisitos parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Área de Concentração: Ecologia

Linhas de Pesquisa: Ecologia de comunidades e Ecossistemas

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivoneide Maria da Silva

Co-orientador: Prof^o Dr^o Sérgio Marcelo Rodríguez Málaga

Belém – PA

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Rosário, Ingrid Nazaré Garcia

Aspectos ecoepidemiológico associados à fauna flebotomínica de um fragmento florestal urbano, no município de Belém, Pará, Brasil / Ingrid Nazaré Garcia Rosário ; Orientadora, Ivoneide Maria da Silva ; Co-orientador, Sérgio Marcelo Rodríguez Málaga. - 2017.

63 f.: il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Belém, 2017.

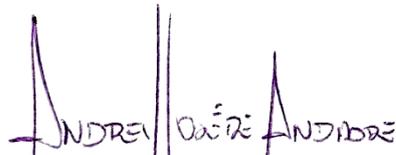
1. Flebotomíneo – pesquisa – Belém (PA). 2. Flebotomíneo – ecologia. 3. Leishmaniose – Belém (PA). 4. Fauna florestal - Amazônia. 5. Florestas – Belém (PA). I. Silva, Ivoneide Maria da, orientadora. II. Málaga, Sérgio Marcelo Rodríguez. III. Título.

CDD – 22 ed. 614.432098115

INGRID NAZARÉ GARCIA ROSÁRIO

ASPECTOS ECOEPIDEMIOLÓGICO ASSOCIADOS À FAUNA
FLEBOTOMÍNICA DE UM FRAGMENTO FLORESTAL URBANO

BANCA EXAMINADORA



ANDREY JOSÉ DE ANDRADE

Dr.º Andrey José de Andrade



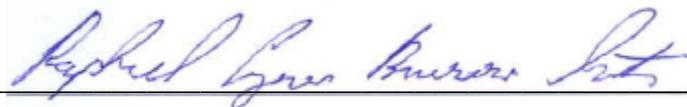
Edna Aoba Yassui Ishikawa

Dr.ª Edna Aoba Yassui Ishikawa]]]]]]



Elizabeth Ferreira Rangel

Dr.ª Elizabeth Ferreira Rangel



Raphael Ligeiro Barros Santos

Dr.º Raphael Ligeiro Barros Santos



Mara Cristina Pinto

Dr.ª Mara Cristina Pinto

“O Aprendizado é o significado mais límpido da vida, pois jamais se termina uma existência sem que se aprenda algo.”

(Maria Clara Fraga Lopes)

A Deus, por ser essencial em minha vida,
aos meus pais e familiares que sempre
me apoiaram e a minha orientadora que
sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, não somente nesses anos como universitária, mas que em todos os momentos iluminou meu caminho;

A Universidade Federal do Pará pela oportunidade de fazer o curso;

A minha orientadora Dr^a Ivoneide Silva, que me acolheu de braços abertos, pela dedicação, amizade e confiança que depositou em mim em todos esses anos no laboratório. A essa pessoal um grande e especial Obrigada.

Ao meu Co-orientador Sérgio Málaga pela paciência e ensinamento.

Agradeço a toda minha família que me deu força para concluir mais essa etapa da minha vida, em especial a meus pais (Rosalia e Luiz) que são as pessoas mais especiais da minha vida, pelo amor, incentivo e apoio incondicional dos meus irmãos (Larissa, Alice e William), que apesar de tudo sempre me deram força.

A todos os integrantes do Laboratório de Parasitologia da UFPA, pelo companheirismo, experiências e competência, que faziam o trabalho do dia-a-dia mais tranquilo e prazeroso.

A equipe do Laboratório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas, por todo o apoio na identificação dos materiais de estudo.

A equipe do Laboratório de Biologia e Celular do Núcleo de Medicina Tropical, pelo apoio na parte de biologia molecular, em especial ao Yago Santos por toda a paciência em me ensinar e corrigir meus erros e a Dra Edna Ishikawa pela disponibilidade e material fornecido para o andamento da pesquisa.

Um agradecimento especial a três pessoas que foram muito importantes nesses dois anos, Ana Lídia, Debora Silve e Rayane Sales, companheiras, amigas, irmãs,

enfim não há palavras para expressar, sempre estiveram ao meu lado tanto nos momentos de desespero quanto nos momentos da alegria, e que com certeza irão continuar presente em minha vida.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que direta ou indiretamente colaboraram com minha caminhada até aqui.

Deus abençoe a todos

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos.....	4
Figura 2: Mapa da Região Metropolitana de Belém, com a localização do fragmento florestal estudado.....	17
Figura 3: Localização dos pontos de coletas.....	18
Figura 4: Flebotomíneos montados em lâmina e lamínula em líquido de Berlese, observados em microscópio óptico.....	19
Figura 5: Riqueza e abundância mensal de flebotomíneos coletados na ERMBE, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, Pa, Brasil.....	27
Figura 6: Índices de diversidade mensal de flebotomíneos coletados na ERMBE, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	28
Figura 7: Variação mensal das variáveis climáticas, Precipitação Acumulada (mm^3), Temperatura Média ($^{\circ}\text{C}$) e Umidade Relativa do Ar Média (%), na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	31
Figura 8: Relação entre o volume de precipitação acumulada (mm^3) mensalmente e a riqueza de espécies de flebotomíneos capturados na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	32
Figura 9: Relação entre o índice de Simpson e a Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$) mensal na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	33
Figura 10: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR do grupo mamíferos em amostras coletada na ERMBE.....	34
Figura 11: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR do grupo aves em amostras coletada na ERMBE.....	35
Figura 12: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR de diferentes intervalos de tempo em amostras mosquitos alimentados em laboratório com sangue de camundongos.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos de vertebrados avaliados como fonte de repasto sanguíneo com respectivos primers, temperatura de hibridação e tamanho do produto da amplificação.....	22
Tabela 2: Relação das espécies de flebotomíneos, identificadas na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, apresentando o respectivo número de espécimes capturados por mês e porcentagem final de indivíduos capturados. Com destaque para as principais espécies de importância médica (*).....	25
Tabela 3: Relação do número de espécies, abundância e índices de diversidade de acordo com os meses de coleta de flebotomíneos na ERMBE, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, Pa, Brasil.....	26
Tabela 4: Análise faunística das espécies de flebotomíneos coletados na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	29
Tabela 5: Análise quantitativa da distribuição vertical das espécies amostradas na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.....	30

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1 – Introdução.....	3
1.1 – Flebotomíneos.....	3
1.2 – Biologia dos flebotomíneos.....	4
1.3 – Dinâmica de crescimento populacional de flebotomíneos.....	6
1.4 – Importância Médica.....	7
1.4.1 – Leishmanioses.....	8
1.4.2 – Distribuição das leishmanioses no Brasil.....	10
1.5 – Ciclos de transmissão de Leishmanioses no Brasil.....	12
2 – Justificativa.....	14
3 – Objetivos.....	16
3.1 – Objetivos Gerais.....	16
3.2 – Objetivos específicos.....	16
4 – Material e Métodos.....	16
4.1 – Área de estudo.....	16
4.2 – Coleta de flebotomíneos.....	17
4.3 – Processamento e identificação de Flebotomíneos.....	19
4.4 – Extração de DNA.....	19
4.5 – Análise da Taxa de infecção.....	20
4.6 – Padronização do tempo de repasto sanguíneo.....	21
4.7 – Identificação da fonte de alimentação sanguínea.....	21
4.8 – Dados meteorológicos.....	22
4.9 – Análises estatísticas.....	23
5. Resultados.....	24
5.1 – Composição e distribuição sazonal das espécies.....	24
5.2 – Distribuição vertical das espécies.....	29

5.3 – Influência das variáveis climáticas na dinâmica populacional.....	30
5.4 – Taxa de infecção.....	33
5.5 – Preferência alimentar.....	33
6 – Discussão.....	36
7 – Conclusão.....	43
8 – Referências.....	45
Anexo I.....	64

RESUMO

Os flebotomíneos são insetos vetores de diversos patógenos causadores de doenças, sendo responsáveis pela transmissão a animais e humanos de inúmeras enfermidades sendo a principal delas as leishmanioses. O presente estudo avaliou os aspectos ecoepidemiológicos da fauna flebotomínica em um fragmento florestal na área urbana no município de Belém (PA). De dezembro de 2015 a novembro de 2016 foram realizadas coletas mensais de flebotomíneos no fragmento florestal e no peridomicílio das residências próximas, com o auxílio de armadilha luminosa do tipo CDC. Coletou-se um total de 4070 flebotomíneos, com identificação de dois gêneros e 24 espécies. A espécie predominante foi *Lutzomyia* (*Trichopygomyia*) *longispina* (32,16%), seguida por *Lutzomyia* (*Evandromyia*) *infraspinosa* (21,72%). Os estimadores de riqueza indicaram que o esforço amostral foi satisfatório para a área estudada. Não houve uma relação significativa entre a precipitação acumulada, a temperatura e a umidade relativa do ar quando analisada com a abundância de flebotomíneos. Quando relacionados às variáveis climáticas com a riqueza de espécies, apenas a precipitação acumulada mensal apresentou uma relação negativa sobre a riqueza de espécies capturadas. Na análise da distribuição vertical o número de espécimes de flebotomíneos capturados ao nível do solo foi significativamente maior do que na copa, onde no solo foram encontradas 21 espécies, sendo quatro delas exclusivas deste estrato e 20 espécies na copa, com três ocorrendo exclusivamente da copa. Foram encontradas quatro espécies com importância epidemiológica, sendo: *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata*, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *ayrozai*, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *paraensis* e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *antunesi*. As fêmeas avaliadas por PCR foram negativas para *Leishmania* spp. E a maioria das fêmeas ingurgitadas analisadas alimentou-se de mamíferos. O conhecimento da fauna em área de preservação sob intensa influência antrópica, pode auxiliar no entendimento da relação entre as espécies e o grau de preservação de uma área, e também no conhecimento de espécies que podem desempenhar papel efetivo na transmissão de agentes patogênicos ao homem e animais.

Palavras – Chave: Phlebotominae, Levantamento faunístico, Ecologia de flebotomíneos, Leishmaniose, Fragmento florestal urbano.

ABSTRACT

Sand flies are insects vectors of several disease-causing pathogens, responsible for the transmission to animals and humans of numerous diseases, the main being leishmaniasis. The present study evaluated the ecoepidemiological aspects of the phlebotominal fauna in a forest fragment in the urban area of Belém (PA). From December 2015 to November 2016, monthly collections of sand flies were carried out in the forest fragment and in the peridomicile of nearby residences, with the aid of a CDC type light trap. A total of 4070 phlebotomines were collected, with identification of two genera and 24 species. The predominant species was *Lutzomyia (Trichopygomyia) longispina* (32.16%), followed by *Lutzomyia (Evandromyia) infraspinosa* (21.72%). The wealth estimators indicated that the sampling effort was satisfactory for the studied area. There was no significant relationship between accumulated precipitation, temperature and relative humidity when analyzed with sandfly abundance. When related to climatic variables with species richness, only the accumulated monthly rainfall presented a negative relation on the richness of captured species. In the analysis of the vertical distribution the number of sandfly specimens captured at ground level was significantly higher than in the canopy, where 21 species were found in the soil, four of them exclusive to this stratum and 20 species in the canopy, with three occurring exclusively in the canopy. Four species with epidemiological importance were found: *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*, *Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai*, *Lutzomyia (Psychodopygus) paraensis* and *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*. The females evaluated by PCR were negative for *Leishmania* spp. And most of the engorged females analyzed were fed on mammals. The knowledge of the fauna in an area of preservation under intense anthropic influence, can help in the understanding of the relation between the species and the degree of preservation of an area, and also in the knowledge of species that may play an effective role in the transmission of pathogens to man and animals.

Key words: Phlebotominae, Fauna survey, Phlebotomine ecology, Leishmaniasis, Forest fragment urban

1. Introdução

1.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos, popularmente conhecidos como “mosquito-palha”, “asa dura” ou “birigui”, são insetos de pequeno porte e corpo delgado, muito piloso, castanhos claros ou cor-de-palha, e reconhecidos por permanecerem com as asas lanceoladas, entreabertas e levantadas durante o repouso (Lewis, 1974). Pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phebotominae. Estão agrupados em seis gêneros pelo mundo: *Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileyia* Herting, 1984 no Novo Mundo; e *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot 1920 e *Chinius* Leng, 1987, encontrados no Velho Mundo (Shimabukuro *et al.*, 2011). A nomenclatura do gênero *Chinius* é utilizada apenas na China por alguns pesquisadores (Miranda, 2015). O gênero *Lutzomyia* é o mais encontrado do Novo Mundo, sendo constituído por 15 subgêneros e 11 grupos de espécies, e apresenta a maior distribuição geográfica, se estendendo desde os Estados Unidos da América até o Norte da Argentina (Young & Duncan, 1994). Atualmente são conhecidas 1.002 espécies de flebotomíneos no mundo, sendo que 277 delas ocorrendo no Brasil, representando uma das faunas mais bem estudadas em todo o mundo (Shimabukuro & Galati, 2011; Bastos, 2014, Shimabukuro *et al.*, 2017).

A Região Amazônica apresenta uma elevada riqueza de flebotomíneos com altos índices de diversidade local, principalmente em florestas de Terra Firme (Barret *et al.*, 1996; Chagas *et al.*, 2016). Um total de 122 espécies de *Lutzomyia*, das mais de 230 descritas, podem ser encontradas na Amazônia brasileira. Mais de 20 espécies são antropofílicas, apresentando possíveis ricos de transmissão de patógenos para os seres humanos, uma vez que muitas delas têm importância como vetoras (Grimaldi *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 2016).

A composição da fauna flebotomínica no estado do Pará também é bastante estudada, principalmente no que se refere ao gênero *Lutzomyia*. Atualmente tem-se o registro de pelo menos 177 espécies (Rangel & Lainson, 2003), para as quais existe uma chave regional de identificação (Aguiar & Medeiros, 2003).

1.2 Biologia dos flebotomíneos

O ciclo de vida dos flebotomíneos envolve uma fase de ovo, quatro estádios larvários, pupa e o estágio final de adulto alado, sendo assim, classificados como holometábolos (Figura 1) (Monteiro, 2012). Os ovos são depositados no solo rico em matéria orgânica, possuem a forma elipsóide e cor negra (Alexander, 2000). Cada fêmea adulta é capaz de ovipor uma média de 28 ovos por postura, que levam em média oito dias para eclodirem (Bastos, 2014).

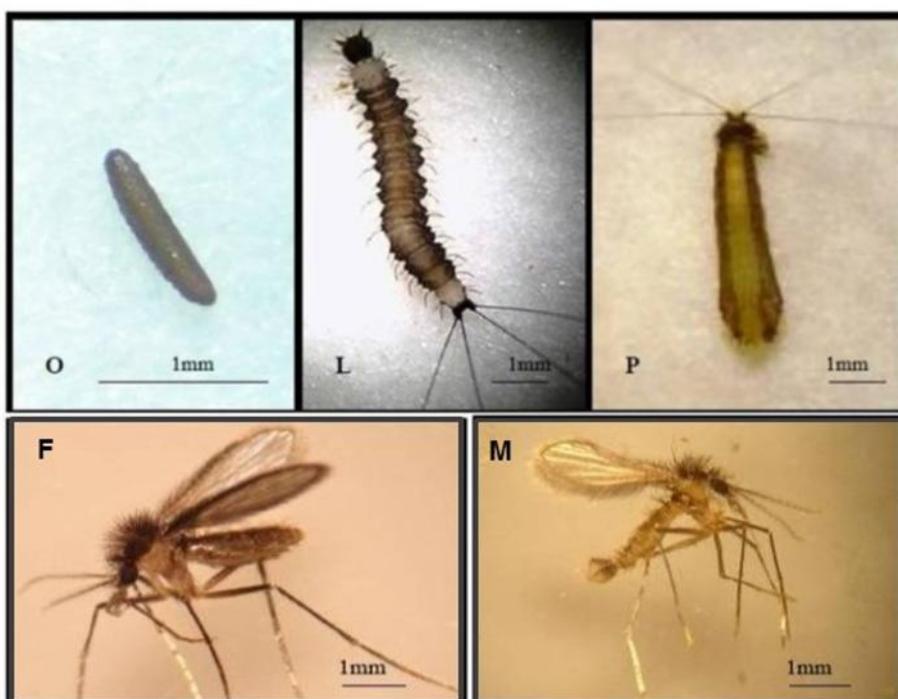


Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos: (O) ovo, (L) larva, (P) pupa, Adultos: (F) fêmea e (M) macho. Fonte: (Santos, 2011)

As larvas são pequenas, de cor esbranquiçada, possuem aspectos vermiformes e se alimentam de matéria orgânica em decomposição. Têm o corpo dividido em cabeça, três segmentos torácicos e nove segmentos abdominais. A cabeça possui um par de antenas, é recoberta de espinhos e o aparelho bucal é do tipo triturador. O tórax é pouco desenvolvido, recobertos de cerdas, que são utilizadas para a identificação das espécies. Os dois últimos segmentos são diferenciados em falsas patas abdominais utilizadas para a movimentação (Bastos, 2014).

As pupas são originárias da larva de quarto estágio, divididas em cefalotórax e abdômen, e ficam fixas no substrato. Possuem 13 segmentos, sendo os quatro primeiros fundidos formando o cefalotórax, e os nove restantes são individualizados formando o abdômen (Brazil & Brazil, 2003). Não se alimentam nesta fase e encontra-se em grande atividade de divisão celular para formar o corpo do adulto, que emerge ao final do processo (Forattini, 2002).

Os adultos são alados e apresentam grande dimorfismo sexual, sendo que as principais diferenças estão nos últimos segmentos abdominais, que são modificados para constituir a genitália do inseto, e no aparelho bucal, sendo o da fêmea adaptado para picar e sugar (Brazil & Brazil, 2003). Alimentam-se de substâncias açucaradas para produzir energia e manter a homeostasia (Azevedo, 2002), porém as fêmeas necessitam se alimentar de sangue para a maturação dos ovos (Monteiro *et al.*, 2012).

Eles movimentam-se em voos saltitantes (Forattini, 1973). A dispersão pode limitar-se a 200 metros ou menos (Chianotis *et al.*, 1974). No entanto, estudos realizados por métodos de soltura e recaptura, avaliando cinco espécies do gênero *Lutzomyia*, encontraram deslocamentos além dos 200 metros, com números variando de menos de cinco a 960 metros em até 96 horas, com valores médios de 320 metros em 24 horas (Alexander & Young, 1992).

O horário de atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturno, avançando especialmente nas primeiras horas da noite (Forattini *et al.*, 1976). Durante o dia podem se encontrar em ecótopos naturais como troncos de árvores, tocas de animais, sob folhas caídas no solo, frestas em rochas e em cavernas, que utilizam como área de repouso e abrigo após a cópula e a hematofagia (Deane & Deane, 1957; Arias & Freitas, 1982; Biancardi & Castellón, 2000; Galati, 2003). Também podem servir como locais de desenvolvimento das formas imaturas (Carvalho, 2011), embora poucos estudos tenham sido bem sucedidos no encontro de criadouros naturais de flebotomíneos neotropicais, devido à dificuldade de encontrar formas imaturas em ambientes naturais (Feliciangeli, 2004; Alencar *et al.*, 2011).

Dentre as espécies de flebotomíneos que habitam ambientes modificados pelo homem, os abrigos artificiais incluem áreas sombreadas e úmidas como os galinheiros, chiqueiros, ou mesmo dentro de residências (Killick-Kendrick, 1999; Brazil & Brazil, 2003). Esse grupo de insetos desempenha um importante papel ecológico, sendo indicado como um excelente bioindicador de ambientes alterados, pois são insetos com comportamento estritamente silvestres e muito sensíveis a mudanças em seu habitats (Barros *et al.*, 2000; Aguiar e Medeiros, 2003)

1.3 Dinâmica de crescimento populacional de flebotomíneos

Os flebotomíneos estão distribuídos por diversas regiões geográficas do mundo, sendo encontrados em maior abundância em regiões tropicais e subtropicais, (Maroli *et al.*, 2013). No Brasil, estão distribuídos por todas as regiões principalmente em áreas florestadas (Farias, 2014).

A distribuição das populações de flebotomos em uma área pode variar ao longo do tempo em função, por exemplo de fatores climáticos (precipitação, temperatura e umidade relativa do ar). A abundância de flebotomíneos em regiões tropicais varia de acordo com a precipitação pluviométrica, sendo que a estação chuvosa pode atuar como fator limitante para a maioria das espécies de flebotomíneos da Amazônia brasileira (Cantuária, 2012).

A maioria das espécies de flebotomíneos da região Neotropical habita áreas de florestas com índice pluviométrico em torno de 2000 mm³ por ano (Forattini, 1973; Young, 1979). As chuvas agem modificando as condições dos criadouros no solo (Rutledge & Ellenwood, 1975). O regime de chuvas ao longo da estação chuvosa, quando em níveis moderados pode beneficiar o desenvolvimento dos flebotomíneos, mas os prejudica quando encharca o chão, eliminando as formas imaturas naquele local (Macedo *et al.*, 2008).

As condições em laboratório de temperatura ótima para o desenvolvimento da maioria das espécies de flebotomíneos neotropicais é de 25°C a 27°C, e umidade relativa do ar em torno de 80%. Qualquer mudança nesses fatores pode implicar

em ciclos mais rápidos caso as temperaturas fiquem ligeiramente acima dessa faixa e temperaturas inferiores afetam o crescimento larvário. Além disso, a atividade do inseto adulto fica diminuída aumentando o tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto (Casanova, 2001; Brazil & Brazil, 2003; Galati *et al.*, 2008). O estudo da variação sazonal da fauna flebotomínica se faz importante para a compreensão da interação entre cada espécie e seu habitat.

Na floresta tropical, o solo e a copa das árvores podem ser vistos como diferentes habitats, com componentes físicos e biológicos distintos. A copa das árvores funciona como um sítio de frutificação e florescência, atraindo vertebrados como primatas e preguiças, que podem servir como fonte alimentar para os flebotomíneos, enquanto o solo oferece abrigo e grande quantidade de matéria orgânica em decomposição que serve de alimento para as formas imaturas (Dias-Lima *et al.*, 2002).

Além disso, as condições climáticas, como temperatura, umidade relativa, intensidade de luz, movimento do ar, níveis de CO₂, e outros, são diferentes na copa e no solo, criando microhabitats distintos. Assim, a distribuição dos flebotomíneos em níveis de estratificação vertical, é provavelmente, uma resposta a um desses fatores, tanto físicos quanto biológicos (Chaniotis *et al.*, 1971).

Algumas espécies de flebotomíneos são capazes de se alimentar de sangue de mamíferos nos estratos superiores das florestas. Um bom exemplo são as fêmeas de *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha, que sobem para a copa à noite para se alimentarem de sangue de preguiça-real (*Choloepus didactylus* Linnaeus) e do tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus), e durante o dia descem e descansam nos troncos das árvores (Ready *et al.*, 1985; Lainson e Shaw, 1998). Portanto, o conhecimento da ocorrência de flebotomíneos em diferentes níveis de estratificação nos ajudar a entender o seu perfil de distribuição nos diferentes estratos arbóreos (Moraes *et al.*, 2015).

1.4 Importância Médica

Do total de 900 espécies de flebotomíneos descritas, aproximadamente 70 foram implicadas na epidemiologia da leishmaniose (Ferreira *et al.*, 2014), principalmente as pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e

Phlebotomus no Velho Mundo (Marzochi, 1992; Duncan, 1994). Além das leishmanioses, os flebotomíneos também agem como vetores de diversas arboviroses, bactérias do gênero *Bartonella* e outros tripanossomídeos, e também afetam as pessoas diretamente com suas picadas que causam alergias e dores (Sherlock, 2003; Marolli *et al.*, 2013).

Dos vírus transmitidos pelos flebotomíneos, os mais importantes estão agrupados nos gêneros *Phebovirus* (família Bunyaviridae) e *Vesiculovirus* (Rhabdoviridae) (Marolli *et al.*, 2013). Os principais transmissores desse vírus são *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia umbratilis* e outros, no Novo Mundo (Miranda, 2015) e *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus perniciosus* no Velho Mundo (Marolli *et al.*, 2013).

O parasito *Bartonella bacilliformis* agente etiológico bartonelose, conhecida também como doença de Carrión, é transmitido pela picada de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e distribuem-se principalmente na região ocidental da Cordilheira dos Andes, Equador, Colômbia e Peru (Sanchez Clemente *et al.*, 2012).

Em geral, entre as doenças transmitidas pelos flebotomíneos, as leishmanioses são as mais importantes. Até 2004, foram relacionadas no Brasil 20 espécies de *Leishmanias* vetoriadas por 30 espécies de flebotomíneos (Desjeux, 2004; Bastos, 2014).

Devido ao processo de urbanização, diferentes tipos de zoonoses, incluindo as leishmanioses têm assumido um papel importante na saúde pública. As alterações no meio ambiente e o movimento migratório das populações atuam de forma determinante na distribuição espacial das populações dos flebotomíneos, pois em áreas que sofrem grande influência humana, apenas as espécies com maior flexibilidade de adaptação conseguem sobreviver (Alves, 2010).

1.4.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Euglenozoa: Trypanosomatidae) (Killick-Kendrick, 1990; Ready, 2013;

Furtado *et al.*, 2016). Classicamente este gênero está dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Esta divisão baseia-se na porção ocupada pelo parasito no tubo digestivo do vetor (Lainson & Shaw, 1987). As espécies do gênero *Leishmania* desenvolvem-se o intestino anterior e médio, na região suprapilária e as espécies do gênero *Viannia* desenvolvem-se tanto no intestino anterior, quanto no médio e posterior, na região peripilária (Motoie, 2013).

Segundo a OMS (2005), as leishmanioses são endêmicas em diversos países do mundo, acometendo principalmente as populações pobres de países em desenvolvimento. Constituem assim um importante problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e epidemiológico (Moschin, 2010)

Existem quatro formas clínicas de leishmaniose humana: visceral, mucocutânea, cutâneo-difusa e cutânea (Desjeux, 2004). Porém, apenas duas denominações são usadas no Brasil: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que engloba todas as formas clínicas com manifestação dérmica (Alves, 2008).

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. A lesão típica é indolor, com formato arredondado ou ovalado, bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e granulações grosseiras (WHO, 2016). No Brasil foram identificados sete espécies do agente etiológico, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três espécies de maior importância epidemiológica no Brasil são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Brasil, 2007; Carvalho, 2011). Na Amazônia as espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia ubiquatis*, *Lutzomyia ayrozai*, *Lutzomyia paraensis*, *Lutzomyia wellcomei* e outras podem ser incriminadas como potenciais vetores de LTA (Chagas *et al.*, 2016).

A forma mais grave de leishmaniose é a LV ou calazar americano, uma doença de evolução que acomete os órgãos internos de mamíferos (Silveira *et al.*, 1997). A LV é uma doença sistêmica, caracterizada por febre, esplenomegalia, perda de peso, astenia, anemia, dentre outras (Romero & Boelaert, 2010). No Brasil, é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*

chagasi, e tem como principal vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Silveira *et al.*, 1997). Esta espécie tem sofrido um processo de adaptação às áreas urbanas. Estudos indicam que um dos fatores que tem determinado a urbanização da LV, é a adaptação do *Lu. longipalpis* ao ambiente antropicamente modificado (Lainson & Rangel, 2005; Carvalho *et al.*, 2010; Saraiva, 2015). No estado do Pará a espécie *Lutzomyia antunesi* foi encontrada infectada com o protozoário *L. infantum* (Ryan *et al.*, 1984).

A LV é endêmica em 62 países nos quatro continentes, a maioria dos quais classificados como em desenvolvimento, onde existem cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco. Cerca de 90% dos casos mundiais estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Michack & Genaro, 2004)

Além da importância médica humana, as leishmanioses também tem importância veterinária, pois esta doença não se restringe a humanos, ocorrendo também em outros mamíferos, sendo o de maior importância o cão doméstico (*Canis familiaris*), que são as principais fontes de infecção no ambiente urbano, intra e peridomicílio (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Fatores como o desequilíbrio socioeconômico, ocupação da terra para atividades agropecuárias, fluxos migratórios, e principalmente a degradação do ambiente são apontados como os principais responsáveis pela dispersão das leishmanioses, pois os flebotomíneos, assim como em outros ciclos endêmicos habitavam inicialmente áreas silvestres (Dujardin, 2006).

1.4.2 Distribuição das leishmanioses no Brasil

As leishmanioses apresentam uma distribuição difusa, composta por pequenos focos de transmissão na maioria das regiões endêmicas, e essa distribuição focal ocorre devido a condições microecológicas que interferem no vetor, no parasito e no hospedeiro reservatório. Por isso, essas doenças apresentam características tão diferentes em cada área de transmissão (Carvalho, 2011). Alterações ambientais causadas tanto pelo homem, quanto por eventos naturais resultam em um aumento ou diminuição da incidência das

leishmanioses, pois influenciam na ecoepidemiologia das doenças (Ashford, 2000; Shaw, 2008; WHO, 2016).

Ao se analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 1980, foram registrados casos autóctones em 19 Estados e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todos os Estados brasileiros (Guia de vigilância em Saúde, 2016).

Nas últimas décadas, a LTA tem apresentado mudanças no seu comportamento. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas (Dias Junior, 2008). Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de surtos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas, como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença (Dias Junior, 2008). No período de 1993 a 2015, a LTA apresentou média anual de 47.861 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 25,9 casos/100.000 habitantes (Guia de vigilância em saúde, 2016; SINAN, 2016).

A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,3% do total de notificados, no período de 1993 a 2015) e com os coeficientes médios mais elevados (81,7 casos/100.000 hab.), seguida das regiões Centro-Oeste (41,6 casos/100.000 hab.) e Nordeste (22,6 casos/100.000 hab.) (SINAN, 2016).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica e têm sido registrados surtos frequentes (Guia de vigilância em saúde, 2016). Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas encontra-se em franca expansão para grandes centros (Michack & Genaro, 2004). A LV está distribuída em 21 Estados e presentes nas cinco regiões brasileiras.

Na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste (Guia de vigilância em saúde, 2016). À medida que

a doença se expandiu para as outras regiões, essa situação vem se modificando e, em 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos do país (Silveira *et al.*, 1997). Na região Norte, no período de 1990 a 2008, houve um aumento de 26,03% dos casos de LV, principalmente no estado do Pará, Tocantins, Roraima e Amapá, sendo que, no Estado do Pará, esse aumento foi muito expressivo (527%)(Brasil, 2008; Oliveira, 2011)

Os dados dos últimos 10 anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Brasil, 2006). No período de 1993 a 2015, a média anual de casos de LV foi de 22.372 casos e a incidência de 14,6 casos/100.000 habitantes, com letalidade média foi 6,9% (SINAN, 2016).

A doença é mais frequente em crianças com menos de 10 anos (41,9%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais acometido (62,8%). A razão da maior suscetibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, pelas formas frustras (oligossintomáticas) ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica (Guia de vigilância em saúde, 2016).

1.5 Ciclos de transmissão das Leishmanioses no Brasil

No Brasil as leishmanioses apresentam diferentes ciclos de transmissão (Brasil, 2007). O ciclo silvestre em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária, a doença é caracterizada como zoonose de animais silvestres, onde os principais hospedeiros são a raposa (*Lycalopex vetulus*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e pequenos roedores, e pode atingir o homem quando entra na floresta para a realização de atividades, geralmente relacionadas ao extrativismo e tornando-se hospedeiro acidental das leishmânias (Brasil, 2007)

O ciclo ocupacional ou de lazer (padrão de áreas impactadas), em que a transmissão está associada à exploração florestal e desmatamento para a construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, treinamento militares e ecoturismo. Neste ciclo, os principais reservatórios de *Leishmanias* são geralmente mamíferos silvestre, porém animais domésticos também podem servir como reservatórios secundários, dada a sua presença próximas as áreas de floresta (Brasil, 2007).

O ciclo rural e periurbano está relacionado ao processo migratório, com ocupação de encostas e aglomerados na periferia de e centros urbanos, associados a matas secundárias ou residuais (Brasil, 2007). Neste caso, é necessário que haja adaptação do vetor ao peridomicílio. Os cães domésticos são as principais fontes de infecção em ambientes urbanos (Brasil, 2006) sendo que outros reservatórios associados ao ser humano tem sido relatados como reservatórios, como o equinos, mulas, roedores domésticos ou sinantrópicos e gatos (Marzochi, 1992; Silva, 2005; Lainson & Shaw, 2005).

No Brasil, as leishmanioses são conhecidas como zoonoses de animais silvestres, onde o homem se torna hospedeiro acidental quando invade as florestas nativas (Lainson, 1983; Lainson *et al.*, 1994). Restringem-se à Floresta Amazônica, resíduos de Mata Atlântica e ao Cerrado, onde estão presentes os reservatórios naturais das espécies de *Leishmania* e seus respectivos vetores (Walsh *et al.*, 1993; Ximenes *et al.*, 2007). Contudo, este perfil epidemiológico vem sofrendo modificações, sendo que todas as regiões apresentam a transmissão domiciliar ou peridomiciliar, e, em alguns casos, é observada a presença destes agravos em áreas metropolitanas (Carvalho, 2011).

Nos últimos 10 anos, um aumento de registros de flebotmíneos em áreas urbanas tem sido relatado em vários estados da Amazônia (Ferreira *et al.*, 2014). No Estado do Pará, a sua ocorrência vem se espalhando em várias mesorregiões, incluindo a região Nordeste do Pará, onde está localizada a capital Belém. A urbanização dos flebotomos é incomum devido aos hábitos silvestres (Killick-Kendric, 1990), no entanto, a crescente adaptação de espécies de flebotomíneos a ecótopos artificiais e condições peridomiciliares, como ocorre no sudeste do Brasil (Silva & Cunha, 2007), sugere que fragmentos florestais com condições

ambientais propícias ao seu desenvolvimento poderiam ser fontes potenciais para permanência destes insetos e manutenção de ciclos de transmissões de *Leishmanias* em ambientes peridomiciliares (Silveira *et al.*, 2002).

A realização de levantamento da fauna de flebotomíneos é importante para ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência e compreender a dinâmica populacional desses insetos, para subsidiar projetos conservacionistas e implementação de políticas de controle epidemiológico (Marinho *et al.*, 2008). Entretanto a ecologia local desses insetos permanece pobremente caracterizada e pouco se sabe sobre o papel vetorial de algumas espécies na manutenção do ciclo silvestre e urbano (Ferreira, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Os flebotomíneos são insetos noturnos ou crepusculares, tem hábitos silvestres, habitando áreas tipicamente de matas. Porém os elevados índices de desmatamentos, tanto para atividades agropecuárias e industriais, quanto para a construção de habitações humanas, provocam alterações no ambiente físico através da fragmentação das florestas (Patz *et al.*, 2004; Miranda, 2015). Com isso algumas espécies de flebotomíneos, que até então apresentavam comportamento silvestre, têm se adaptado às condições adversas e conseguido explorar novos ambientes, sendo encontradas próximas ou dentro de habitações humanas.

Os estudos relacionados à fauna flebotomínica em fragmentos florestais urbanos ainda são muito escassos, porém muito importantes, pois contribuem para o melhor entendimento da composição e comportamento destas populações em ambientes com características silvestres, porém inseridos em área antrópica. Estes fragmentos apresentam características interessantes para estudos ecológicos que busquem entender as adaptações de populações animais que vivem em áreas sob grande influência de ações antrópicas. Neste sentido, a identificação das espécies ocupando estes tipos de ambiente, além da caracterização de padrões, tais como, a dinâmica sazonal de crescimento e a

distribuição das populações nos estratos verticais fornecem informações importantes para a compreensão desse tipo de ecossistema.

O conhecimento sobre a fauna flebotomínica em determinada região e o comportamento das espécies que vivem ali também é imprescindíveis para o entendimento da dinâmica de transmissão de patógenos, em especial as leishmanioses. Diversas espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas como vetores de *Leishmania* e essa associação é feita de acordo com a espécie dominante em uma área de transmissão endêmica. Por isso, estudos sobre a prevalência de infecção por *Leishmania* em flebotomíneos são importantes indicadores sobre a intensidade de transmissão do parasito (Rossi *et al.*, 2008; Miranda, 2015).

A área da Estação Radiogoniométrica da Marinha de Belém apresenta um fragmento de floresta bem preservado e condições climáticas propícias para o desenvolvimento de uma fauna variada de flebotomíneos e de animais que atuam como reservatórios de *Leishmania*. Além disso, por se tratar de um fragmento florestal urbano, a existência de moradias contíguas aos seus limites permite avaliar a existência do processo de domiciliação por alguma espécie de flebotomíneo o que favoreceria a transmissão de leishmanioses para a população humana.

A avaliação da infecção natural de flebotomíneos por espécies de *Leishmanias*, estudos de distribuição geográfica dos vetores, análise das condições ambientais e a identificação taxonômica do inseto são de extrema importância clínica e ecoepidemiológica para ampliar o conhecimento das leishmanioses e, além disso, auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias de controle da doença (Michalsky *et al.*, 2002; Basano & Camargo, 2004; Floeter-Winter, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar aspectos ecológicos da fauna flebotomínica em um fragmento florestal na área urbana no município de Belém (PA) e avaliar o papel dessas populações como potenciais vetores de espécies de *Leishmania*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o levantamento da fauna de flebotomíneos no fragmento florestal urbano da Estação Radiogoniométrica da Marinha assinalando potenciais vetores de leishmanioses presentes na área;
- Caracterizar mensalmente, ao longo de um ano, riqueza, abundância e composição da fauna de flebotomíneos presente na área de estudo;
- Avaliar a distribuição da fauna de flebotomíneos no gradiente vertical (copa e solo);
- Avaliar a influência de variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) na dinâmica populacional de flebotomíneos da área de estudo, ao longo de um ano,
- Diagnosticar a taxa de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* e correlacionar *Leishmania*-flebotomíneo vetor de leishmanioses na área;
- Identificar fontes de repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos na área de estudo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A área da Estação Radiogoniométrica da Marinha de Belém (ERMBE), situa-se no bairro da Marambaia, na Rodovia Augusto Montenegro, km 01, nas coordenadas 048°26'43.74"S e 048°26'39.8"W (Figura 2). Foi criada em 8 de janeiro de 1969, com a denominação de Estação de Rádio de Belém. Está localizada num terreno de cerca de 1.300.00m² (130 hectares), possui prevalência do clima do tipo Cwb de Koppen, com precipitação média anual de 348,36 mm e

temperatura média anual de 32,5 °C, oscilando entre máximas de 34,6 °C e mínimas de 22 °C (INMET, 2015).

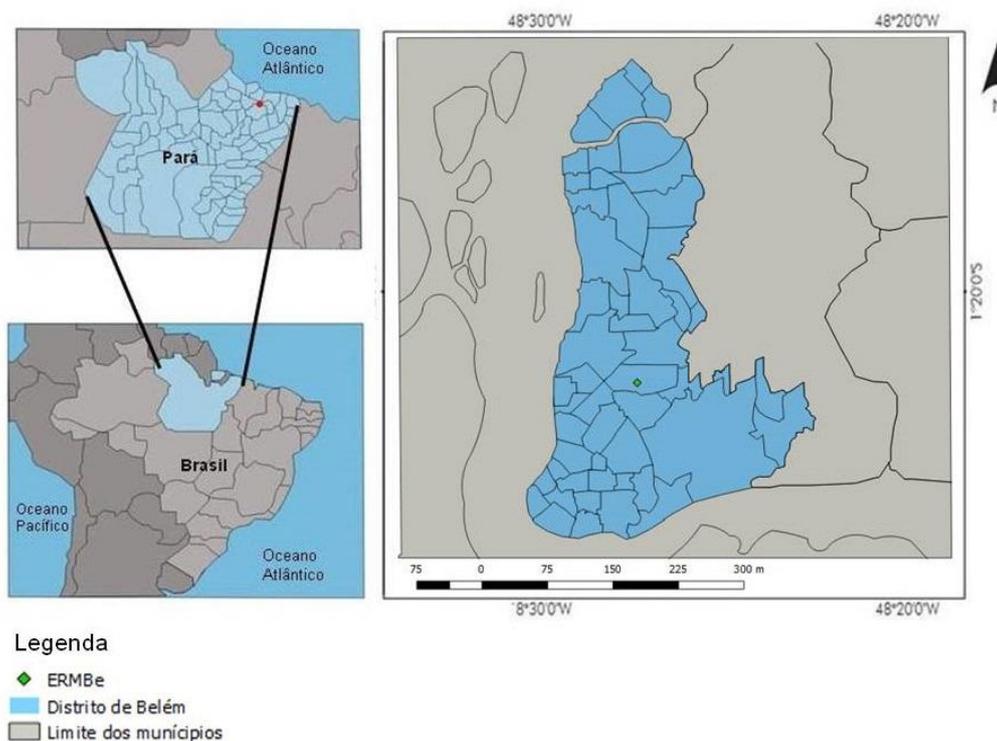


Figura 2: Mapa da Região Metropolitana de Belém (PA), apresentando a localização do fragmento florestal estudado (ERMBE).

A vegetação é caracterizada, principalmente, por floresta ombrófila aberta com dossel uniforme e presença de lianas em diferentes estratos (Silva, 2013).

A área ao redor do fragmento florestal é totalmente urbanizada, com habitações contíguas ao muro que a delimita. Há grande circulação de pessoas, com vários pontos comerciais e moradias.

4.2 Coleta de flebotomíneos

Para captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC (Center of Disease Control) (Sudia & Chamberlain, 1962). As armadilhas CDC foram instaladas entre 17:00 e 18:00h, sendo recolhidas na manhã seguinte, por volta das 7:00h, após, pelo menos, 12 horas de coleta. As armadilhas foram distribuídas em seis pontos dentro da ERMBE, com distância mínima de

aproximadamente 100m entre elas (Figura 3), sendo duas armadilhas / ponto, uma ao nível do solo (1,5m) e na copa (>10m), totalizando 12 armadilhas por noite. Visando diagnosticar a presença de flebotomíneos nas áreas urbanizadas em volta da ERMBE, seis armadilhas foram instaladas no peridomicílio de residências contíguas a área. As coletas foram realizadas mensalmente por três noites consecutivas, totalizando 36 coletas mensais na área da mata (18 em copa e 18 em solo) e 18 na área urbana.



Figura 3: Localização dos pontos de coletas dentro e fora do fragmento florestal estudado.

Visando avaliar a dinâmica periodicidade de flebotomíneos, as coletas foram realizadas campanhas mensais de coleta ao longo de 12 meses (de Dezembro de 2015 a Novembro de 2016), totalizando um esforço amostral de 432 horas de coleta.

O material coletado foi levado ao Laboratório de Parasitologia (ICB/UFGA) para triagem dos flebotomíneos. Os espécimes foram separados por sexo e acondicionados em eppendorf (1,5 mL) contendo álcool à 70%, no caso dos machos. As fêmeas foram armazenadas em Isopropanol (C₃H₈O) para melhor conservação do material genético, para a identificação da taxa de infecção e preferência alimentar das mesmas, por meio de PCR.

4.3 Processamento e identificação de Flebotomíneos

A identificação em nível específico foi realizada no Instituto Evandro Chagas, com o apoio da equipe de Entomologia do Laboratório de Leishmanioses. A identificação de espécies se deu por meio dos caracteres morfológicos evidenciáveis, sendo realizada com o auxílio de microscópio óptico, chaves dicotômicas e literatura de apoio.

Parte dos flebotomíneos capturados foram submetidos a clarificação e diafanização, que tem como objetivo possibilitar a montagem e observação dos caracteres taxonômicos durante a identificação específica. O processo consiste em submeter os flebótomos ao contato com uma série de reagentes para o amolecimento e clarificação das estruturas quitinizadas, seguida de montagem entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese (Cerqueira, 1943)

Os machos foram montados inteiros, em vista lateral, enquanto as fêmeas foram montadas com as partes separadas, com o tórax posicionado em vista lateral e a cabeça e o abdômen em vista ventral, permitindo assim a melhor visualização das estruturas morfológicas importante para a identificação (Figura 4). Foi utilizada a chave taxonômica proposta por Young e Duncan (1994).



Figura 4: Flebotomíneos montados em lâmina e lamínula em líquido de Berlese, observados em microscópio óptico, em aumento de 40x. A: macho; B: fêmea. Fonte: Carvalho, 2011

4.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído dos flebotomíneos inteiros, sem dissecação previa do trato digestivo. As fêmeas foram colocadas individualmente em tubos de 1,5 ml para

trituração utilizando ponteiras de 200 µm descartáveis em 10 µl de solução de extração (grinding mix) (Anexo I). Após a trituração foram adicionados mais 240 µl de grinding mix e 25 µl de solução de SDS (Anexo I), incubando-se por 15 minutos a 65°C em banho seco.

Em seguida as amostras foram colocadas em gelo por 5 minutos, centrifugou-se rapidamente e adicionou-se 160 µl de acetato de potássio e agitado por aproximadamente 10 segundos, centrifugado e levado ao gelo por 30 minutos. Centrifugou-se os tubos por 2 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo tubo com 600 µl de Isopropanol absoluto e homogeneizado por inversão. Foi novamente centrifugado por 2 minutos a 13000 rpm e descartado o sobrenadante.

Adicionou-se então 600 µl de etanol 70% e feita nova centrifugação nos mesmos parâmetros das anteriores. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram colocados em estufa a 37°C para secagem. O DNA foi redissolvido em 20 µl de solução TE (Anexo I). Em seguida os tubos foram estocados a -20°C para posterior utilização na PCR.

4.5 Análise da Taxa de infecção

A qualidade da extração de DNA genômico dos flebotomíneos foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos CB3-PDR (5' – CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAAT GATA – 3') e N1N-PDR (5' – GGTA(C/T)(A/T)TTGCCGCGA(T/A)TTCG(T/A) TATGA – 3') que amplificam um fragmento de 544 bp (pares de bases) do DNA mitocondrial de flebotomíneos (Dias Junior, 2008).

Para amplificar a região constante no mini-exon do kDNA do gênero *Leishmania* foram utilizados oligonucleotídeos S1629 (5' - GGGAA TTCAATAWAGTACAGAACTG - 3') e S1630 (5' – GGGAAAGCTTCTGTACTWTA TTGGTA - 3') (Dias Junior, 2008).

Os produtos da amplificação foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% preparada com tampão de TAE (Anexo I), tendo como marcadores de peso molecular fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos

em pares de bases, dentro da faixa compatível de tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

Após o término da PCR, os produtos foram guardados em freezer, até a visualização por meio da eletroforese, realizada a 100V/ 50mA por uma hora, em gel de agarose a 1% preparada com tampão de TAE (Anexo I), tendo como marcadores de peso molecular fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos em pares de bases, dentro da faixa compatível de tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

4.6 Padronização do tempo de repasto sanguíneo

Visando saber até quanto tempo depois de realizado o repasto sanguíneo pelas fêmeas de flebotômios é possível a detecção de DNA do sangue do hospedeiro, foram realizados testes com fêmeas de mosquitos da espécie *Aedes albopictus* criados em laboratório, alimentadas com sangue de camundongos. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas em gaiolas apropriadas, sendo retirada, para a realização da PCR, uma fêmea logo após ter sido realizado o repasto, e as demais, a cada 24h, durante 5 dias. A análise de PCR foi realizada com *primer* para a detecção de sangue de mamíferos.

4.7 Identificação da fonte de alimentação sanguínea

As fêmeas coletadas que apresentavam o abdômen parcialmente ou completamente ingurgitado de sangue foram submetidas a procedimento para identificação da fonte de alimentação sanguínea. Para isso, a extração de DNA foi realizada individualmente para cada fêmea ingurgitada.

Para a identificação da fonte alimentar foi utilizado a PCR com oligonucleotídeos que amplificam o gene CYTB (Chang *et al.*, 2008). Desta forma, foi possível a determinação de repasto sanguíneo realizado pelo mesmo flebotômio em diferentes hospedeiros.

A escolha dos *primers* utilizados foi realizada com base nos principais grupos de vertebrados presentes em áreas silvestres e urbanizadas. Desta forma a investigação para o repasto sanguíneo dos flebotômios abrangeu os seguintes grupos: humanos, cães, gatos, aves, roedores e primatas. A tabela 1 descreve as

sequências específicas nos *primers* que foram utilizados, com respectivas temperaturas de hibridização e o tamanho da fita de DNA amplificada (Chang *et al.*, 2008).

Após o término da PCR, os produtos foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparada com tampão de TAE (Anexo I).

Tabela 1: Grupos de vertebrados avaliados como fonte de repasto sanguíneo com respectivos primers, temperatura de hibridização e tamanho do produto da amplificação.

Animal Testado	Sequencia do <i>primer</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridização (°C)	Produto da amplificação (pb)
AVE	F: CAAATATCNTTCTGAGGNGCYAC R: GGGTGTTCDACDGGTTGGCTNCC	64	508
MAMÍFEROS	F: CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG R: TGTAGTTRTCWGGGTCHCCTA	59	772
CÃO	F: GAACTAGGTCAGCCCGGTTACTT R: CGGAGCACCAATTATTAACGGC	67	153
GATO	F: TTCTCAGGATATACCCTTGACA R: GAAAGAGCCCATGAGGAAATC	72	180
HUMANO	F: TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC R: TATGCGGGGAAACGCCATATCG	70	228
PRIMATA	F: AGTTGCYCACATACCCG R: GTRTARTAGGGRTGRAATC	72	480
RATO	F: CGGCCACCCAGAAGTGATACATC R: GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG	67	196

Fonte: Chang *et al.*, 2008 (adaptado)

4.8 Dados Meteorológicos

Os dados referentes a fatores climáticos foram obtidos no site do INMET, através do Sistema de Informação Meteorológica Automática de Superfície, da estação 4201 de Belém (código OMM 81680). As estações meteorológicas automáticas coletam, a cada minuto, informações meteorológicas (temperatura, umidade, pressão, precipitação, velocidade e direção do vento, radiação solar) da área onde está localizada. Estes dados são integralizados e disponibilizados para serem transmitidos, via satélite ou telefonia celular, para a sede do INMET, em Brasília. O conjunto dos dados recebidos é validado, através de um controle de qualidade e armazenado em um banco de dados.

Os dados são disponibilizados gratuitamente, em tempo real, através da internet (http://www.inmet.gov.br/sonabra/maps/pg_automaticas.php) para a elaboração de previsão do tempo e dos produtos meteorológicos diversos de interesse de usuários setoriais e do público em geral e para uma vasta gama de aplicações em pesquisa em meteorologia, hidrologia e oceanografia

4.9 Análises Estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas do programa Excel[®] do Office 2013 e as análises foram realizadas utilizando o programa R e o DivEs 3.0 (Rodrigues, 2015).

Para verificar a interferência das variáveis climáticas sobre a abundância e na riqueza de espécies foi utilizada análise de Regressão Linear. A comparação da riqueza e a abundância entre os estratos arbóreos foi realizada por meio de Teste t com variâncias separadas. Para avaliar se o esforço amostral foi satisfatório utilizou os estimadores de riqueza Chao 2, Jackknife 1, Jackknife 2, e Bootstrap.

Para estimativa da diversidade de flebotomíneos utilizou-se o índice de diversidade de Simpson, Shannon e Margalef (Magurran, 1988; Service, 1993). A constância das espécies foi avaliada segundo o índice \underline{c} (Dajoz, 1973) e para a indicação de espécies dominantes foi adotado o índice de Berger-Parker (Magurran, 1988).

5. Resultados

5.1 Composição e distribuição sazonal das espécies

Durante os 12 meses de coletas foram capturados um total de 4070 espécimes, pertencentes a dois gêneros, *Lutzomyia* e *Brumptomyia*, e 24 espécies (Tabela 2). O gênero *Lutzomyia* foi o que apresentou o maior número de espécies (23 espécies), totalizando 97,79% dos indivíduos capturados, enquanto o gênero *Brumptomyia* representou apenas 2,21%, sendo representado apenas por uma espécie.

Duas espécies de flebotomíneos apresentaram uma alta abundância, representando 53,88% do total de espécimes coletadas: *Lutzomyia (Tri.) longispina* (32,16%) e *Lutzomyia (Eva.) infraspinosa* (21,72%).

A abundância das demais espécies coletadas ficou abaixo de 10% do total coletado, sendo 13 espécies apresentaram abundância intermediária (de 8% a 1%), representando 44,18% dos espécimes coletados e nove espécies ficaram com abundância muito baixa (< 1%), representando 1,94% dos espécimes coletados.

Dentre as espécies identificadas, quatro são consideradas vetoras de espécies de *Leishmanias*: *Lu. (Nys.) flaviscutellata* (270 indivíduos), *Lu. (Psy.) ayrozai* (175 indivíduos) e *Lu. (Psy.) paraensis* (42 indivíduos) e *Lu. (Nys.) antunesi* (166 indivíduos).

A ocorrência de flebotomíneos no peridomicílio de residências contíguas ao fragmento foi registrada apenas no mês de janeiro, onde foram encontrados sete espécimes, sendo quatro *Lu. (Nys.) flaviscutellata* e três *Lu. (Nys.) antunesi*.

Tabela 2: Relação das espécies de flebotomíneos, identificadas na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, apresentando o respectivo número de espécimes capturados por mês e porcentagem final de indivíduos capturados. Com destaque para as principais espécies de importância médica (*)

Espécies	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Total	(%)
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) longispina</i>	136	262	60	5	60	40	75	69	54	175	167	206	1309	32,16
<i>Lutzomyia (Evandromyia) infraspinosa</i>	131	159	28	11	9	3	46	31	36	127	134	169	884	21,72
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) rorotaensis</i>	43	46	24	0	9	1	35	26	6	59	37	42	328	8,06
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*</i>	25	101	15	1	9	4	15	9	12	19	32	28	270	6,63
<i>Lutzomyia (Sciopemyia) sordellii</i>	24	50	9	2	0	0	4	10	7	47	31	21	205	5,04
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai*</i>	4	56	9	13	18	24	14	6	4	9	8	10	175	4,30
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*</i>	9	68	20	4	14	6	5	8	2	7	12	11	166	4,08
<i>Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata</i>	2	32	1	2	3	2	5	18	18	24	17	9	133	3,27
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata</i>	0	32	9	0	30	4	26	3	1	8	9	5	127	3,12
<i>Lutzomyia (Viannamyia) furcata</i>	1	18	16	2	2	2	4	15	13	11	4	19	107	2,63
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) davisii</i>	0	35	15	4	5	7	7	2	1	5	5	4	90	2,21
<i>Brumptomyia travassosi</i>	4	2	2	0	0	1	0	8	6	14	7	13	57	1,40
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	7	15	0	0	5	2	6	6	5	2	0	6	54	1,33
<i>Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi</i>	0	5	1	0	3	0	7	4	5	9	3	7	44	1,08
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) paraenses*</i>	0	13	0	1	4	4	5	2	5	1	2	5	42	1,03
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) gomezi</i>	11	9	2	1	2	0	3	3	2	1	2	4	40	0,98
<i>Lutzomyia (Evandromyia) monstruosa</i>	0	2	0	0	0	0	2	2	4	3	1	3	17	0,42
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) trinidadensis</i>	0	6	0	0	0	0	0	0	2	3	0	2	13	0,32
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) corossoniensis</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) micropyga</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0,05
<i>Lutzomyia evangelistai</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0,05
<i>Lutzomyia aulari</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,02
<i>Lutzomyia pacaе</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,02
<i>Lutzomyia lutziana</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,02
Total	399	912	214	46	174	100	260	222	183	525	471	564	4070	100

A riqueza de espécies, abundância e índices de diversidade de flebotomíneos por mês de coleta estão apresentados na tabela 3

Foi coletado mensalmente em média $399,16 \pm 245,81$ indivíduos e $16,08 \pm 2,45$ espécies. Os dados demonstram que houve uma relação positiva entre a abundância e a riqueza de espécies ($r^2 = 0,444$; $p < 0,05$), ou seja, nos meses em que houve maior abundância também foram observadas as maiores riquezas de espécies de flebotomíneos. O mês de janeiro apresentou a maior abundância registrada no estudo e foi o mês que registrou maior riqueza de espécies capturadas (19 espécies).

Tabela 3: Relação do número de espécies, abundância e índices de diversidade de acordo com os meses de coleta de flebotomíneos na ERMBe, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, Pa, Brasil.

Ano	Período	Mês	Nº de espécies	Abundância	Shannon_H	Simpson_D	Margalef
2015	Chuvoso	Dezembro	14	399	1,734	0,755	2,171
		Janeiro	19	912	2,289	0,855	2,641
		Fevereiro	16	214	2,262	0,861	2,795
		Março	11	46	2,024	0,829	2,612
		Abril	15	174	2,130	0,823	2,714
2016	Estiagem	Maio	13	100	1,882	0,767	2,606
		Junho	17	260	2,235	0,847	2,877
		Julho	17	222	2,295	0,850	2,961
		Agosto	18	183	2,290	0,848	3,263
		Setembro	19	525	2,031	0,803	2,874
		Outubro	16	471	1,889	0,775	2,437
		Novembro	18	564	1,914	0,764	2,683
Médias±SD			16,08±2,45	339,16±245,81			

A maior abundância de flebotomíneos capturados foi no período de estiagem (Junho à Novembro) com 2225 espécimes coletados, enquanto que no período chuvoso (Dezembro à Maio) foi capturado um total de 1845 indivíduos.

A dinâmica periódica de crescimento populacional sugere um padrão de distribuição unimodal, com as maiores abundâncias sendo observadas de

setembro a janeiro (\geq a 400 indivíduos) e as menores nos meses de fevereiro a agosto ($<$ 300 indivíduos) (Figura 5).

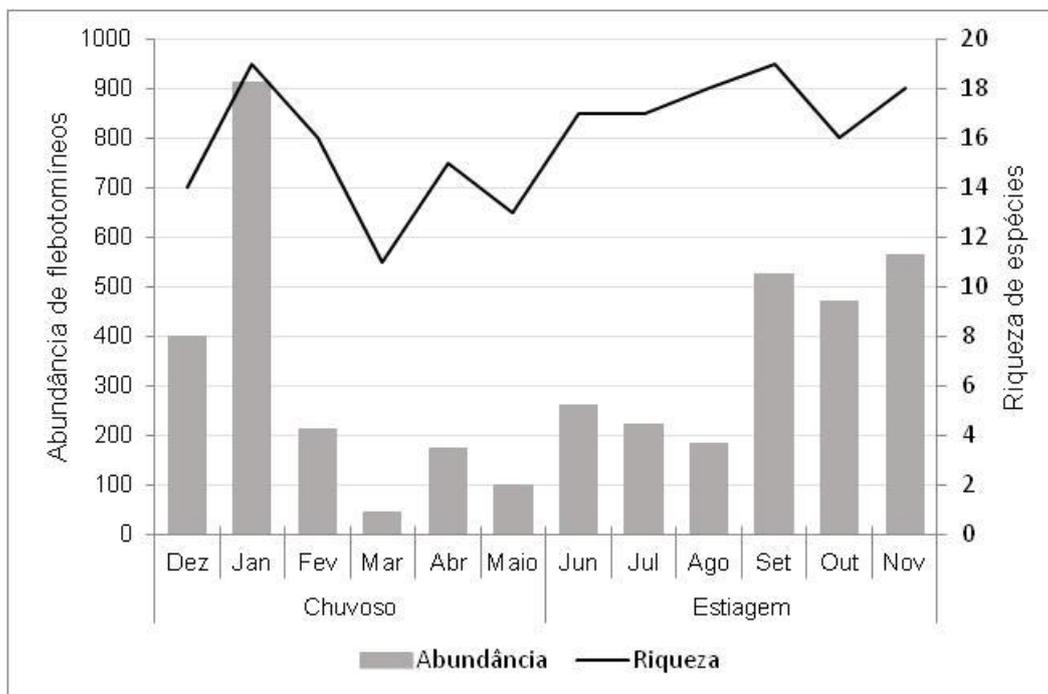


Figura 5: Riqueza e abundância mensal de flebotomíneos coletados na ERMBE, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, Pa, Brasil.

Avaliando-se os índices de diversidade alfa calculados por mês de coleta observou-se que o índice de Simpson apresentou pouca variação ao longo do ano (Tabela 3, Figura 6). O menor valor obtido para este índice ocorreu no mês de dezembro, indicando ser este o mês de maior diversidade. Para os índices de SHANNON e Margalef, quanto maior o valor do índice maior a diversidade, portanto, segundo o Índice de Shannon a maior diversidade na comunidade de flebotomíneos na ERMBE ocorreu no mês de julho e conforme o Índice de Margalef, a maior diversidade foi observada no mês de agosto..

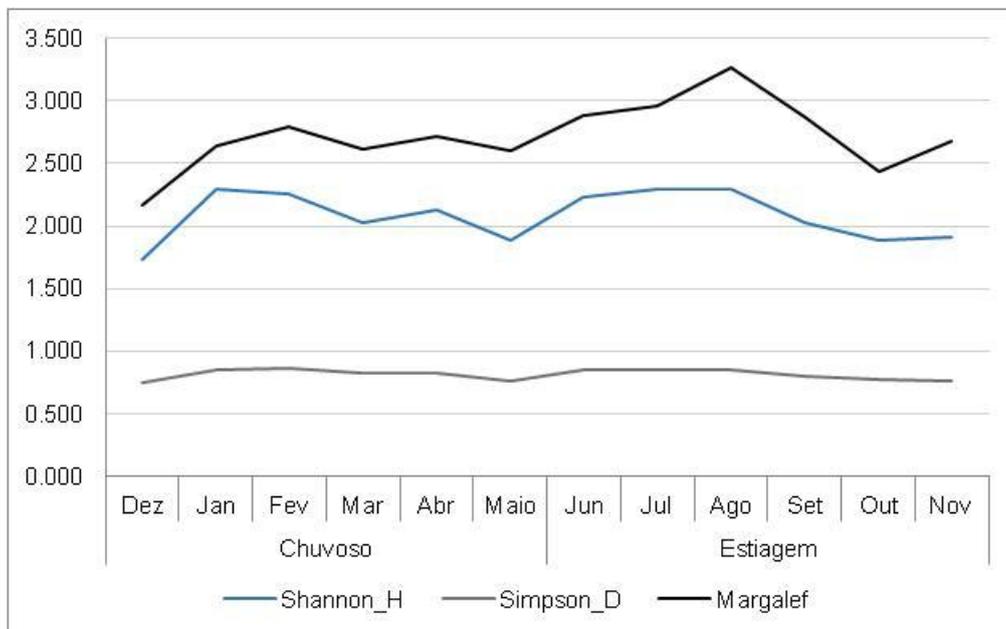


Figura 6: Índices de diversidade mensal de flebotomíneos coletados na ERMBE, no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.

O número de espécies de flebotomíneos identificadas na área (24 espécies) foi próximo do valor calculado pelos estimadores de riqueza (Chao 2 = 25,83, Jackknife 1 = 27,67, Jackknife 2 = 29,48 e Bootstrap 25,64), sugerindo que o esforço amostral foi satisfatório.

De acordo com as análises faunísticas realizadas, o gênero *Brumptomyia*, apesar de ser representado apenas por uma espécie se mostrou constante, aparecendo em mais de 50% das coletas realizadas, frequente e dispersa, presente em quase todos os meses de coleta, porém em pequenas quantidades.

O gênero *Lutzomyia*, que representou mais de 98% das espécies amostradas, apresentou duas espécies dominantes, muito frequentes, constantes e muito abundantes, representando mais de 53% do total de indivíduos capturados: *Lu. (Eva.) infraspinosa* e *Lu. (Tri.) longispina*. Algumas espécies se comportaram como raras, sendo pouco frequentes, não dominantes e acidentais, aparecendo apenas uma vez durante todo o período de coleta: *Lu. (Psy.) corossoniense*, *Lu. evangelistai*, *Lu. aulari*, *Lu. paca* (Tabela 4)

Tabela 4: Análise faunística das espécies de flebotomíneos coletados na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.

Espécies	Constância	Dominância	Frequência	Abundância
<i>Brumptomyia (Brumptomyia) travassosi</i>	X	ND	F	D
<i>Lutzomyia (Evandromyia) infraspinosa</i>	X	D	MF	MA
<i>Lutzomyia (Evandromyia) monstruosa</i>	X	ND	F	R
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) gomezi</i>	X	ND	MF	D
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) rorotaensis</i>	X	ND	MF	A
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) micropyga</i>	Z	ND	PF	R
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata</i>	X	ND	MF	A
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi</i>	X	ND	MF	C
<i>Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi</i>	X	ND	F	D
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai</i>	X	ND	MF	C
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) paraensis</i>	X	ND	MF	D
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata</i>	X	ND	MF	C
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) corossoniensis</i>	Z	ND	PF	R
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) davisii</i>	X	ND	MF	D
<i>Lutzomyia (Sciopemyia) sordellii</i>	X	ND	MF	A
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) trinidadensis</i>	Y	ND	F	R
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) longispina</i>	X	D	MF	MA
<i>Lutzomyia (Viannamyia) furcata</i>	X	ND	MF	C
<i>Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata</i>	X	ND	MF	C
<i>Lutzomyia evangelistai</i>	Z	ND	PF	R
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	X	ND	F	D
<i>Lutzomyia aulari</i>	Z	ND	PF	R
<i>Lutzomyia lutziana</i>	Z	ND	PF	R
<i>Lutzomyia pacaе</i>	Z	ND	PF	R

Constância: X: constante; Y: acessórias; Z: acidentais; Dominância: D: dominantes; ND: não dominantes; Frequência: MF: muito frequente; F: frequente; PF: pouco frequente; Abundância: MA: muito abundante; C: comum; D: disperso; R: raro.

5.2 Distribuição vertical das espécies

Apesar do número de espécimes de flebotomíneos capturados ao nível do solo ter sido maior do que na copa, não houve uma diferença estatística significativa ($t=1.804$; $df=23$; $p>0.05$). Do total de 4070 espécimes coletados, 996 (24,47%) foram capturadas na copa das árvores, agrupados em 20 espécies, sendo três delas encontradas exclusivamente na copa: *Lu. (Tri.) trinidadensis*, *Lu. (Lu.) evangelistai* e *Lu. pacaе*. Ao nível do solo foram capturados 3074 espécimes (75,53%), agrupadas em 21 espécies, sendo quatro espécies coletadas exclusivamente no solo: *Lu. (Eva.) monstruosa*, *Lu. (Mic.) micropyga*, *Lu. aulari* e *Lu. lutziana* (Tabela 5).

Tabela 5: Análise quantitativa da distribuição vertical das espécies amostradas na ERMBe no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil

Espécies	Copa	Solo
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) longispina</i>	218	1091
<i>Lutzomyia (Evandromyia) infraspinosa</i>	62	822
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) rorotaensis</i>	183	145
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata</i>	14	256
<i>Lutzomyia (Sciopemyia) sordellii</i>	8	197
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai</i>	61	114
<i>Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi</i>	121	45
<i>Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata</i>	69	64
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata</i>	71	56
<i>Lutzomyia (Viannamyia) furcata</i>	69	38
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) davisii</i>	28	62
<i>Brumptomyia (Brumptomyia) travassosi</i>	6	51
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	9	45
<i>Lutzomyia (Pintomyia) damascenoi</i>	20	24
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) paraenses</i>	13	29
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) gomezi</i>	27	13
<i>Lutzomyia (Evandromyia) monstrosa</i>	0	17
<i>Lutzomyia (Trichopygomyia) trinidadensis</i>	13	0
<i>Lutzomyia (Psychodopygus) corossoniense</i>	1	1
<i>Lutzomyia (Micropygomyia) micropyga</i>	0	2
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) evangelistai</i>	2	0
<i>Lutzomyia aulari</i>	0	1
<i>Lutzomyia pacaie</i>	1	0
<i>Lutzomyia lutziana</i>	0	1
Total de indivíduos	996	3074
Total de espécies	20	21
Número de espécies exclusivas	3	4

5.3 Influência das variáveis climáticas na dinâmica populacional

Foi observada pouca variação na temperatura durante o período de coleta (26,2 °C a 28,1°C). A umidade relativa do ar variou de 74,5% a 87,3%, enquanto a precipitação apresentou a maior variação durante o ano, indo de 79,4 mm³ no mês de Outubro até 518,4 mm³, no mês de Fevereiro (Figura 7)

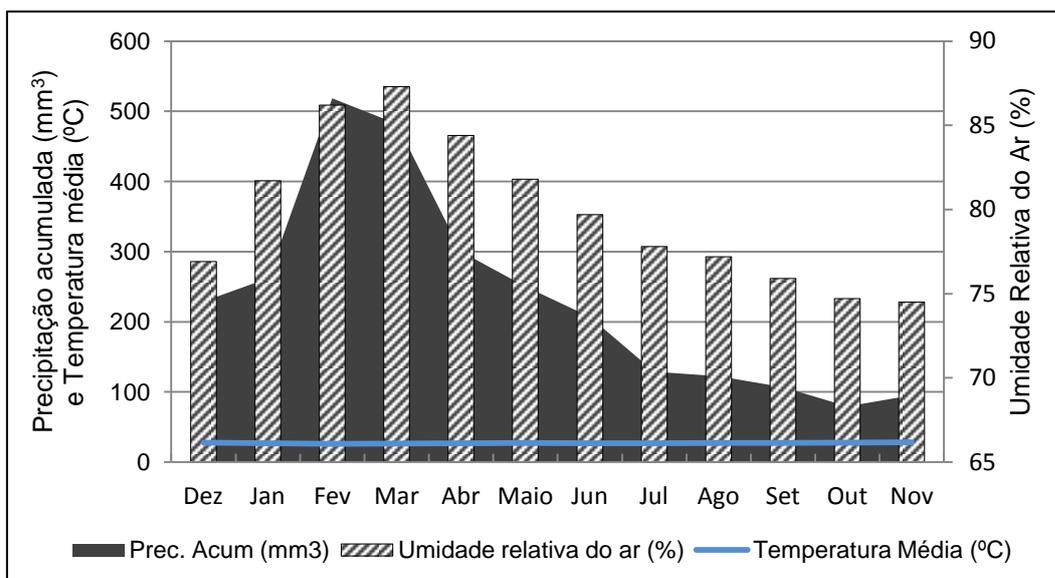


Figura 7: Variação mensal das variáveis climáticas, Precipitação Acumulada (mm³), Temperatura Média (°C) e Umidade Relativa do Ar Média (%), no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, na ERMBE, Belém, PA, Brasil.

Foi observada uma relação negativa entre temperatura e pluviosidade ($r^2=0,701$; $p<0,05$), sendo as temperaturas máximas registradas nos meses em que houve menor quantidade de chuvas. Além disso, foi observada uma relação positiva entre pluviosidade e a umidade relativa do ar ($r^2=0,880$; $p<0,05$), ou seja, quando houve maior quantidade de chuva, também foi registrado maior umidade relativa do ar.

Não foi observado efeito significativo da precipitação ($r^2=0.148$; $p>0.05$), da temperatura ($r^2=0.212$; $p>0.05$) e Umidade Relativa do Ar ($r^2=0.441$; $p>0.05$) sobre a abundância dos flebotomíneos.

Quando avaliou-se o efeito das variáveis climáticas sobre a riqueza mensal de espécies, apenas a precipitação influenciou significativamente no número de espécies coletadas, apresentando uma relação negativa, ou seja, quanto menor o volume de precipitação mensal, maior foi o número de espécies capturadas ($r^2=0.334$; $p<0.05$) (Figura 8).

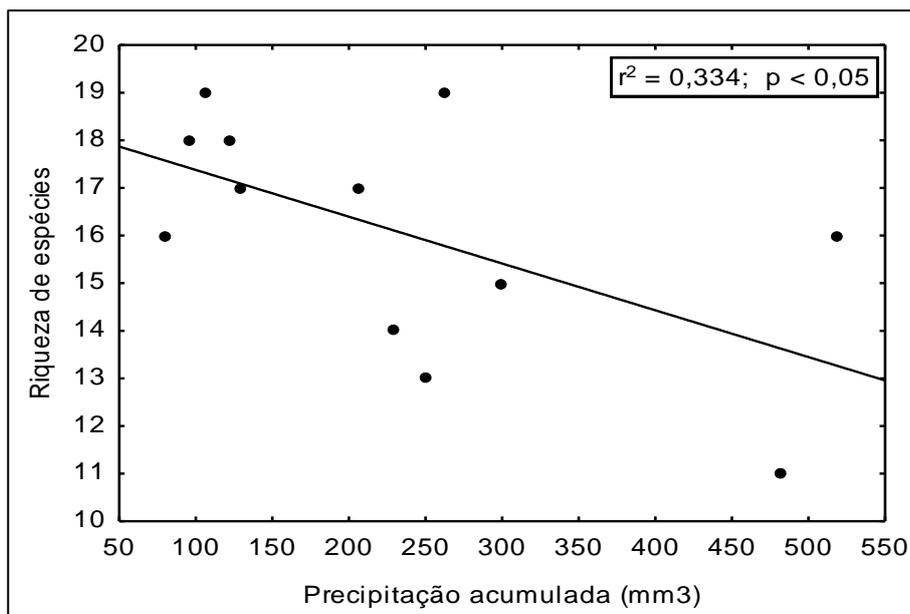


Figura 8: Relação entre o volume de precipitação acumulada (mm^3) mensalmente e a riqueza de espécies de flebotomíneos capturados na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.

Quando avaliado o efeito das variáveis climáticas sobre os índices de diversidade, a única variável que apresentou resultado significativo foi a Temperatura sobre o índice de Simpson ($r^2 = 0.558$; $p < 0.05$), que apresentou uma relação negativa, demonstrando que quanto menor a temperatura média, maior o índice de diversidade de Simpson, ou seja, as menores diversidades ocorreram nos meses em que houve as menores temperaturas (Figura 9).

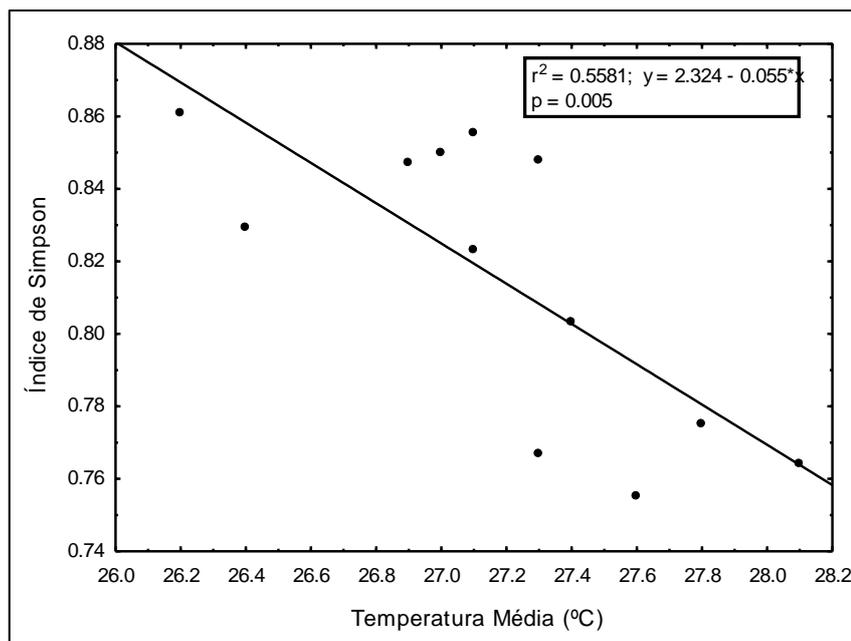


Figura 9: Relação entre o índice de Simpson e a Temperatura média (°C) mensal na ERMBE no período de Dezembro de 2015 à Novembro de 2016, Belém, PA, Brasil.

5.4 Taxa de infecção

A análise por meio de PCR para a detecção de infecção por *Leishmanias*, foi realizada em 172 fêmeas das quais 75 eram *Lu. (Nys.) flaviscutellata*, 51 eram *Lu. (Nys.) antunesi*, 28 *Lu. ayrozai*, e 18 *Lu.(Psy.) paraensis*. Todos os resultados foram negativos para infecção por *Leishmanias* nas espécies amostradas.

Não foi possível a realização do ensaio de PCR em todas as fêmeas coletadas, pois parte delas foram danificadas durante o processo de identificação.

5.5 Preferência alimentar

Para analisar a preferência alimentar dos flebotomíneos capturados no fragmento florestal da ERMBE, 41 fêmeas ingurgitadas foram utilizadas para realização dos ensaios de PCR, sendo um indivíduo de *Lu. (Psy.) davisii* e *Lu (Via). furcata*, dois de *Lu (Nys.). antunesi*, *Lu.(Sci.) sordelli* e *Lu (Psy.). ayrozai*,

quatro *Lu. (Nys.) flaviscutellata* e *Lu (Psy.). paraensis*, 11 *Lu. (Tri) longispina* e 14 *Lu. (Eva) infraspinosa*.

Em todos os testes realizados foi possível apenas a identificação de alimentação no nível de grupo, no caso de mamíferos (Figura 10). Das 41 amostras analisadas, 25 foram positivas para esse tipo de fonte de alimentação.

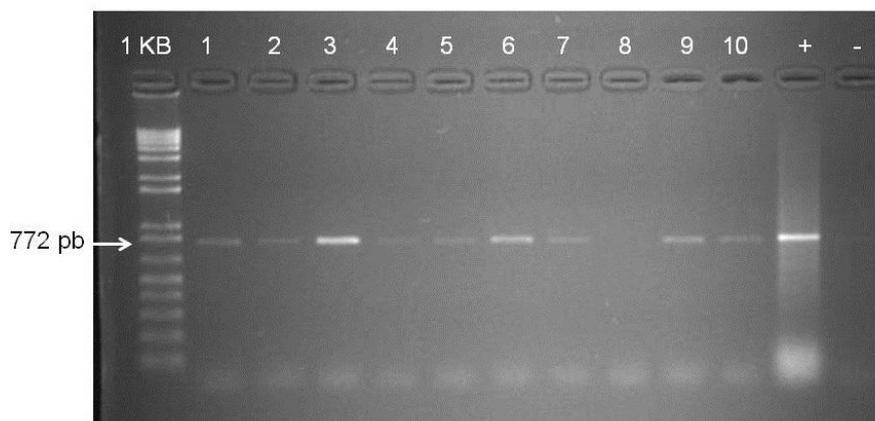


Figura 10: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR do grupo mamíferos em amostras coletada na ERMBE. 1Kb: peso molecular; 1-9: amostras positivas; 8: amostra negativa; +: controle positivo; -: controle negativo.

Nas 25 amostras com resultados positivo para mamíferos, foram realizados testes mais específicos para determinar o tipo de mamífero utilizado para o repasto sanguíneo, a constar, cachorro, rato, humano e gato. Porém os resultados foram negativos.

As amostras negativas para sangue de mamíferos foram avaliadas para a presença de sangue de aves, porém os resultados também foram negativos (Figura 11).

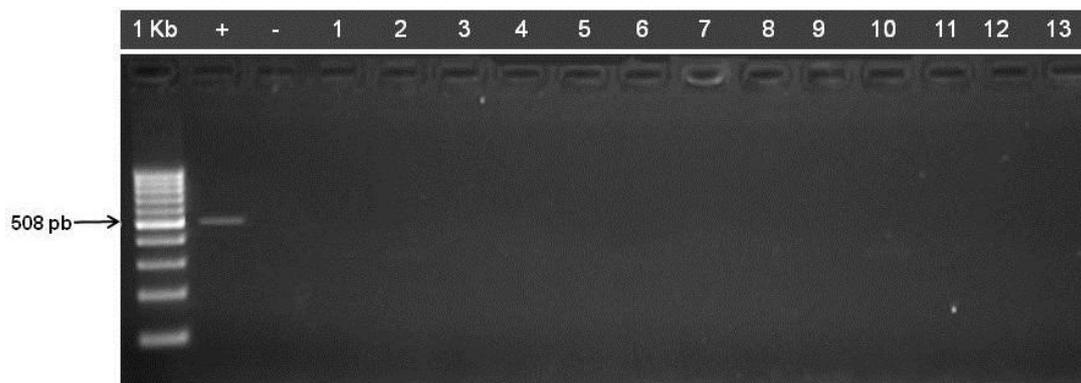


Figura 11: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR do grupo aves em amostras coletada na ERMBE. 1Kb: peso molecular; +: controle positivo; -: controle negativo; 1-13: amostras negativas.

Os testes realizados para identificar até quanto tempo é possível detectar a presença de DNA do hospedeiro no repasto sanguíneo nas fêmeas ingurgitadas, demonstraram que até 24 h após repasto sanguíneo é possível a identificação a presença de DNA da fonte alimentar (Figura 12). Em todas as amostras com mais de 24 h (48h, 72h e 84h) não foi possível detectar a presença de DNA do hospedeiro.

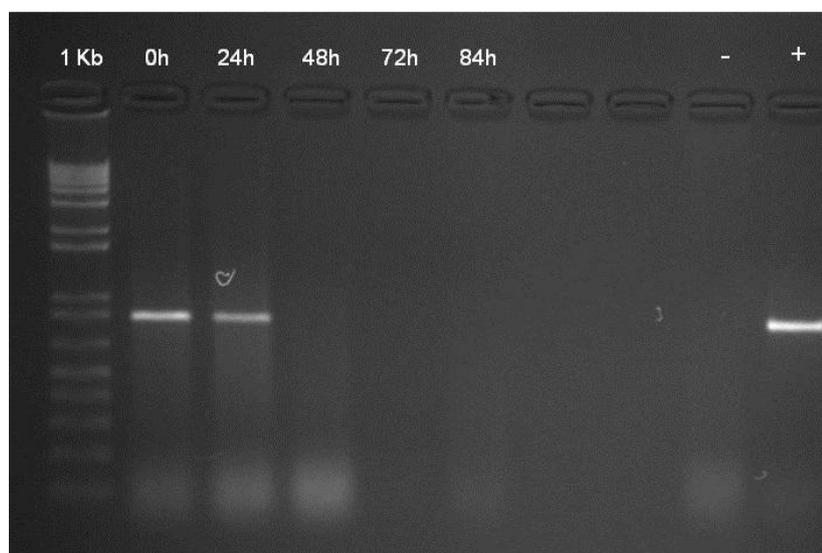


Figura 12: Gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando o produto amplificado da reação de PCR de diferentes intervalos de tempo em amostras mosquitos alimentados em laboratório com sangue de camundongos. 1Kb: peso molecular; +: controle positivo; -: controle negativo; 1-13: amostras negativas.

6. DISCUSSÃO

A fauna de flebotomíneos da área metropolitana de Belém tem sido estudada desde a década de 40 (Damasceno *et al.*, 1946), mas poucos dados recentes referem-se à distribuição de espécies nos fragmentos florestais remanescentes.

A área metropolitana de Belém é composta por 154 fragmentos florestais e quatro parques urbanos com áreas variando de 1 a 1.200 hectares (Ferreira *et al.*, 2012). Além disso, dados anteriores e recentes têm sido demonstrado que alguns destes fragmentos podem ser sítios de desenvolvimento dos flebotomíneos (Ferreira *et al.*, 2014). Nesse sentido, de 1940 a 2014, foram realizados diversos estudos entomológicos em áreas florestais de Belém e arredores, como Utinga (Belém), Aurá (Ananindeua) e Pirelli (Marituba), fornecendo informações relevantes sobre a composição e distribuição das espécies de flebotomíneos na região metropolitana de Belém (Ferreira *et al.*, 2014)

A riqueza de espécies observada no fragmento florestal da ERMBE durante o presente estudo (24 espécies) está de acordo com os resultados observados em outros estudos realizados na região metropolitana de Belém. Uma pesquisa recente realizada em uma área de 19,1 hectares, no município de Ananindeua, encontrou uma riqueza de 23 espécies (Lima, 2013), enquanto uma riqueza de 22 espécies foi obtida avaliando-se sete fragmentos florestais de diferentes tamanhos na região metropolitana de Belém (Ferreira *et al.*, 2014).

A grande predominância do gênero *Lutzomyia* sobre o gênero *Brumptomyia*, encontrado neste trabalho, se assemelha a um estudo realizado em um fragmento florestal do município de Ananindeua (Lima, 2013), em que foi encontrada 24 espécies, das quais apenas duas eram do gênero *Brumptomyia*.

Embora se reconheça que o estudo da sazonalidade só apresenta dados confiáveis e consistentes quando se tem uma investigação de, no mínimo dois anos consecutivos, para comparação de resultados, diminuindo-se as margens de erros proporcionadas por anos atípicos (Dias *et al.*, 2007), este estudo

troux informações importantes sobre a dinâmica populacional das populações da ERMBE ao longo de um ano. Foi observada uma frequência mensal irregular da fauna de flebotomíneos, sendo que a maior abundância de indivíduos se deu no período de estiagem. Estes dados diferem dos resultados obtidos por Lima (2013) no município de Ananindeua e Jeraldo *et al.* (2012) em Aracaju, onde a maioria dos espécimes foram capturados nos períodos em que houve uma elevada precipitação.

Fatores climáticos como temperatura, umidade e pluviosidade, influenciam as populações de flebotomíneo, dependendo da região analisada. A sazonalidade dos flebotomíneos está relacionada com padrões de distribuição de chuvas (Rutledge & Ellenwood, 1995). Barata *et al.*, (2004) encontrou uma relação significativa entre pluviosidade e umidade na dinâmica destes insetos em Porteirinha, Minas Gerais. No presente estudo não foi verificada uma relação significativa da temperatura nem da umidade relativa do ar sobre a riqueza de espécies e abundância de indivíduos, no entanto estes insetos foram comumente encontrados em altas densidades nos meses mais secos. Resultados semelhantes têm sido observados em outros estudos (Zeledon *et al.*, 1984; Dias *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que a temperatura apresentou pouca variação durante o período avaliado (apenas 2°C) o que pode ter dificultado a detecção do efeito desta variável sobre as populações de flebotomíneos.

Os índices de diversidade são importantes ferramentas para analisar as populações de seres vivos. Embora haja discordância a respeito de sua real utilidade, é fato que geram dados qualitativos e quantitativos importantes para a compreensão do comportamento de espécies em relação a determinados ambientes (Farias, 2014)

As maiores diversidades, estabelecidas pelos índices de SHANNON e de Margalef ocorreram para meses do período de estiagem (julho e agosto, respectivamente), sugerindo que o período em que ocorrem menos chuvas proporcione mais abrigos, fontes de alimento e matéria orgânica para os flebotomíneos. Este conjunto de condições para a manutenção da população

de flebotomíneos foi demonstrado em outros trabalhos (Teodoro *et al.*, 1993; Galati, 2008; Moschin, 2010).

O índice de Simpson, no entanto, indicou que a maior diversidade ocorreu no mês de dezembro, que corresponde ao começo do período chuvoso, tais características também foram encontradas nos trabalhos de Alencar (2007), Macedo *et al.*, (2008) e Saraiva *et al.*, (2015).

Os flebotomíneos são muito sensíveis à alterações de umidade, portanto seus habitats caracterizam-se por possuírem pouca variação na temperatura e umidade, pois, uma pequena variação de um destes fatores nos microhabitats altera a dinâmica das populações destes insetos (Dias *et al.*, 2007). A avaliação da distribuição dos flebotomíneos no gradiente vertical na área da ERMBE encontrou um número similar de espécies explorando o nível do solo e a copa das árvores (10m), porém a abundância de indivíduos foi maior ao nível do solo. Resultados semelhantes foram relatados por Genaro *et al.*, (1986) e Dias- Lima *et al.*, (2002) onde o maior número de indivíduos também ocorreu em armadilhas colocadas abaixo de 10m de altura.

Estudos realizados na Reserva Ducke, na Amazônia Central (Arias & Freitas, 1982) e em Roraima (Castellón *et al.*, 1989) demonstraram que espécies como *Lu. (Psy.) ayrozai*, *Lu. (Psy.) davisii*, *Lu. (Psy.) paraensis*, *Lu. (Tri.) trinidadensis* e *Lu. (Via.) tuberculata* foram coletados em maiores alturas (10m e 15m), sendo poucos representativos em armadilhas colocadas a 1m. No fragmento estudado todas estas espécies também foram mais abundantes ao nível do solo. O padrão de captura das espécies *Lu. (Eva.) monstruosa*, *Lu. (Mic.) micropyga* e *Lu. lutziana* na área estudada ocorreu exclusivamente no solo, obedecendo ao relatado na literatura (Arias & Freitas, 1982, Castellón *et al.*, 1989).

A distribuição das espécies de flebotomíneo ao longo do gradiente vertical tem sido frequentemente relacionada com a busca de fonte de alimentação sanguínea. Espécies como *Lu. (Eva.) infraspinosa*, *Lu. aragaoi* e *Lu. Trichopyga*, por exemplo, são citadas como fortemente rodentofílicas e muito comuns em tocas de tatus (Ready *et al.*, 1983). Este comportamento justificaria

a captura dessas espécies em alturas de até 1 metro, tornando-se raras ou ausentes em alturas acima de 10 metros.

A ocorrência de flebotomíneos na copa das árvores indica que algumas espécies têm a capacidade de explorar a cobertura florestal (Moraes *et al.*, 2015). Estudos em que foi encontrada a ocorrência concomitante, e significativa, de machos e fêmeas no dossel indicam que este ambiente pode ser usado para acasalamento. As fêmeas podem se mover para cima para se alimentar de sangue de mamíferos que estão presentes na copa (Nadkarni, 1994, Parker, 1995).

Fatores como presença de abrigos, maior quantidade de animais para alimentação, oportunidade de acasalamento e microhabitats estáveis poderiam favorecer a presença de maior abundância de flebotomíneos no nível de solo, do que na copa das árvores (Arias & Freitas, 1982). O estudo de flebotomíneos acrodendrófilos, ou seja, a tendência de algumas espécies de flebotomos silvestres frequentarem a copa das árvores é de grande interesse pelo fato de que muitas doenças têm respaldo em ciclos enzoóticos, das quais vertebrados que habitam a copa das florestas participam como hospedeiros (Cantuária, 2012).

A presença de algumas espécies relacionadas a transmissão de leishmanioses em fragmentos de florestas cercados por áreas urbanas pode possibilitar a adaptação destas espécies a ambientes antropizados (Lainson *et al.*, 1994). Quatro das espécies identificadas no fragmento da ERMBE são consideradas vetoras de leishmanioses (*Lu. (Nys.) flaviscutellata*, *Lu. ayrozai*, *Lu. (Psy.) paraensis* e *Lu. (Nys.) antunesi*), sendo que foram coletados exemplares de duas delas no peridomicílio de residências do entorno (*Lu. (Nys.) flaviscutellata* e *Lu. (Nys.) antunesi*). Estes dados sugerem a necessidade de um monitoramento constante desta área para detectar um possível processo de urbanização.

Lutzomyia (Nys.) flaviscutellata é incriminada como vetor da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Ward, 1977) e tem sido coletada com infecção natural no norte do Brasil (Lainson & Shaw 1968). Não é considerada uma espécie antropofílica, ocorrendo sempre em áreas florestadas (Souza *et al.*,

2010 e Oliveira *et al.*, 2011). As espécies *Lu. (Psy) paraensis* e *Lu. (Psy.) ayrozai* são prováveis vetoras de *Leishmania (Viannia) naiffi* agente causador leishmaniose tegumentar (Rangel & Lainson. 2003). São espécies de flebotomíneos antropofílas, cuja distribuição geográfica compreende o Brasil, Guiana Francesa, Colômbia e Panamá. No estado do Pará já foram coletada em mais de 10 localidades com isca humana, armadilha de luz e armadilha de Shannon (Rangel & Lainson. 2003). *Lutzomyia. (Nys.) antunesi* é uma espécie considerada altamente antropofílica, podendo ser capturada principalmente em ocios de troncos de árvores, tocas de animais e peridomicílio das residências, por meio de armadilhas luminosas CDC e eventualmente em armadilha de Shannon (Ryan, 1986).

É o provável vetor de *Leishmania (Viannia) lindenbergi* que é o mais novo agente de LTA, descrito no Estado do Pará (Silveira *et al.* 2002). Além disso, em um trabalho realizado na Ilha do Marajó, foram encontrados três exemplares de *Lu. (Nys.) antunesi* infectados por promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Essa infecção é de particular interesse visto que demonstra que o *Ny. antunesi* poderia ser um vetor secundário de leishmaniose visceral (Ryan, 1984).

Embora o número de indivíduos capturados neste estudo no peridomicílio tenha sido baixo isso sugere a possibilidade de adaptação a ambientes antrópicos, como tem sido relatado em outros estudos (Pardo *et al.*, 2006; Santamaria *et al.*, 2006 e Trujillo *et al.*, 2013).

Segundo Marzochi & Marzochi (1997) dois diferentes padrões epidemiológicos de transmissão de Leishmanioses ocorrem na região Amazônica: silvestre-florestal – onde a doença é uma zoonose de animais silvestres, com ocorrência de alguns casos humanos em áreas de colonização recente devido a penetração do homem em ambiente silvestre; e silvestre-periflorestal – onde a doença é uma antropozoonose, que ocorre em áreas de ocupação situadas dentro do raio de voo dos vetores silvestres.

Cada espécie de *Leishmania* apresenta um quadro ecológico associado, com hospedeiros reservatórios, vetor e distribuição geográfica própria. Esses diferentes tipos de associações podem resultar num ciclo de transmissão

específico, onde somente algumas espécies de flebotomíneos são considerados importantes vetores.

Foi realizado o ensaio de PCR em 210 fêmeas e todas com resultado negativo para *Leishmania*. Esta taxa de infecção baixa ou ausente em flebotomíneos já foi relatada por outros autores (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006; Neitzke *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010). O número relativamente baixo de espécimes testados por PCR pode ter reduzido a probabilidade de encontrar uma fêmea positiva neste estudo, assim como observada por vários autores em áreas endêmicas para leishmanioses (Barretto, 1943; Lainson *et al.*, 1985; Casanova *et al.*, 1995; Galati *et al.*, 1996). Como tal, esses resultados negativos não descartam a possibilidade de estar havendo circulação desses protozoários dentro da área estudada.

A análise do conteúdo intestinal de fêmeas de flebotomíneos, demonstrou uma ampla utilização de mamíferos para realização do repasto sanguíneo, não sendo possível a identificação a nível mais específico, a cerca de que espécies de mamíferos foi utilizado no repasto. Estudos demonstram que certas espécies de flebotomíneo mostravam maior afinidade alimentar por mamíferos (suíno, bovino, cão, eqüino, homem ou roedores) ou aves (Paiva, 2009). Contudo, Casanova (2001) verificou que esses insetos ajustam seu padrão alimentar à disponibilidade de hospedeiros.

Christensen *et al* (1980) ressaltaram que, apesar da afinidade desses insetos por determinados hospedeiros, eles eram oportunistas, pois se alimentavam do sangue de diversos tipos de mamíferos. Tesh *et al* (1972) observaram, ainda, que esses insetos tiveram maior afinidade por roedores, mas mostraram também maior amplitude de hospedeiros. Foi verificado ainda que a variação do hábito alimentar desses dípteros, provavelmente, refletia diferenças na composição da fauna do local de coleta.

Cabe ressaltar que o fato de alguns testes não amplificarem nenhuma amostra de DNA isso não significa que o repasto sanguíneo não tenha sido realizado nos espécimes testados. Alguns fatores podem ter interferido nestas análises, como, o fato das fêmeas ficarem acondicionadas em Isopropanol por um tempo elevado (> 3 meses), os flebotomíneos terem realizados o repasto

sanguíneo em outra fonte alimentar não abordada no estudo, o vestígio de sangue não ter sido suficiente para a amplificação do DNA ou tempo em que a fêmea realizou o repasto sanguíneo tenha excedido 24 horas.

Os resultados dos experimentos sobre a detecção de DNA após diferentes intervalos de tempo demonstraram a capacidade de detecção de DNA de camundongo até 24 horas após o repasto sanguíneo. Outros estudos sobre a identificação de sangue em flebotomíneos utilizando o mesmo protocolo, relataram uma capacidade de detecção do DNA do hospederio por 1 a 5 dias (Abbasi *et al.*, 2009; Garlapati *et al.*, 2012; Haouas *et al.*, 2007; Kent & Norris, 2005; Sant'Anna *et al.*, 2008; Valinsky *et al.*, 2014; Sales, 2015).

A devastação de grandes áreas silvestres, e conseqüentemente a fragmentação deste ambiente, induz a adaptação de insetos vetores à essa nova realidade, com isso doenças são introduzidas nas periferias ou centros urbanos, pois ocorre a aproximação de vetores e hospedeiros do peridomicílio em busca de fontes de alimentos (Sales, 2015).

A área no entorno da ERMBE apresenta características totalmente urbanas. Na maioria dos locais de coleta havia a presença de cães e matéria orgânica em decomposição. O acúmulo de matéria orgânica no solo é sabidamente um dos fatores que propiciam a formação de ambiente favorável para a ocorrência de flebotomíneos, portanto a reorganização e limpeza do ambiente peridoméstico podem diminuir o risco de transmissão de *Leishmania* (Teodoro *et al.*, 1995; de Souza *et al.*, 2014). O cão doméstico é reconhecido como o principal reservatório urbano de *Leishmania infatum* no Brasil e seu papel como reservatório de *Le. brazilensis* precisa ser esclarecido (Gontijo & Melo 2004; Marzochi & Marzochi 1994; Dantas-Torres, 2010).

No entanto, um dos locais de coleta em que houve a presença de flebotomíneos no peridomicílio, não apresentava matéria orgânica em decomposição, nem animais domésticos, assim como no estudo realizado por Saraiva (2015). É importante salientar que a captura de espécimes de flebotomíneos fora da área de mata não significa que estes estejam se reproduzindo fora do ambiente silvestre. Alterações no micro-habitat das espécies podem levar as mesmas a se dispersarem. Portanto, são necessários

novos estudos avaliando a reprodução de flebotomíneos no peridomicílio das residências antes de se cogitar a ocorrência de um processo de urbanização na área.

O conhecimento da fauna em área de preservação sob intensa influência antrópica, poderá auxiliar no entendimento da relação entre as espécies e o grau de preservação dessa área, e bem como auxiliar no conhecimento de espécies que podem desempenhar papel efetivo na transmissão de agentes patogênicos ao homem e outros animais. Uma vez que para determinar espécies de flebotomíneos como vetoras de doenças, a densidade populacional, a periodicidade, o ciclo circadiano e a atividade de picada ao nível do solo, estão associadas principalmente com o grau de exposição humana às espécies silvestres de flebotomos vetores de doenças. (Chaniotis *et al.*, 1971).

7. CONCLUSÃO

Na área da ERMBE existe uma comunidade de flebotomíneos bem estabelecida, tendo sido identificadas 24 espécies, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Brumptomyia*;

A espécie predominante foi *Lutzomyia (Tricopygomyia) longispina* (32,16%), seguida por *Lutzomyia (Evandromyia) infraspinosa* (21,72%), que representaram 53,88% do total de flebotomíneos capturados na área;

Foi observado uma abundância mensal irregular da fauna de flebotomíneos, sendo que a maior porcentagem de flebotomíneos capturados se deu no período de estiagem;

O gradiente vertical analisado (1,5m e 10m) foi utilizado pela maioria das espécies identificadas na área, sendo apenas três espécies encontradas exclusivamente na copa (*Lu. (Tri.) trinidadensis*, *Lu. (Lu.) evangelistai* e *Lu. pacaе*) e quatro espécies coletadas exclusivamente ao nível do solo (*Lu. (Eva.) monstruosa*, *Lu. (Mic.) micropyga*, *Lu. aulari* e *Lu. lutziana*);

A avaliação da influência de variáveis climáticas na dinâmica populacional de flebotomíneos da área de estudo demonstrou uma influência negativa significativa da precipitação sobre a riqueza de espécies e da Umidade relativa do ar sobre a abundância;

Foram identificadas quatro espécies com importância epidemiológica na área de estudo: *Lu. (Nys.) flaviscutellata*, *Lu. (Psy.) ayrozai*, *Lu. (Psy.) paraensis* e *Lu.. (Nys.) antunesi*;

Não foram identificadas fêmeas infectadas por *Leishmania* spp na área de estudo. A grande maioria das fêmeas ingurgitadas analisadas utilizaram mamíferos como fonte de repasto sanguíneo, no entanto não foi possível a identificação específica;

Foram capturados espécimes de flebotomíneos das espécies *Lu. (Nys.) flaviscutellata* e *Lu. (Nys.) antunesi*. fora da área de mata, indicando a necessidade de novos estudos avaliando a reprodução de flebotomíneos no peridomicílio das residências. Estes dados sugerem a necessidade de um monitoramento constante desta área para detectar um possível processo de urbanização.

8. REFÊRENCIAS

Abassi, I. *et al.* Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9, 79-86.

Aguiar, G. M. & Medeiros, W. M (2003). Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel, E. F. & Lainson, R. organizadores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 207-55.

Alencar, R. B. (2007). Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: Uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. *Acta Amazonica* 37, 287-292.

Alencar, R. B.; Queiroz, R. G. & Barrett, T. V. (2011). Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropical* 118, 204-208.

Alexander, B. & Young, D. G (1992). Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 387-395.

Alexander, B. (2000) Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 109-122

.

Alves, W. C. L. (2010). Bactérias isoladas de culicídeos (Diptera: Nematocera) hematófagos em Belém, Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1, 131-142.

Arias, J. R. & Freitas, R. A. (1982). On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central. 4. Sand fly emergence from a terra firme forest floor. *Acta Amazonica* 12, 609-611.

Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30, 1269-1281

Azevedo, A. C. R.; Souza, N. A.; Menezes, C. R. V.; Costa, A. C.; Costa, S. M.; Lima, J. B. & Rangel, E. F. (2002). Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in North of State of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 459-464.

Barata, R. A.; Silva, J. C. F.; Costa, R. T.; Fortes-Dias, C. L.; Silva, J. C.; Paula, E. V. *et al.* (2004). Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 481-487.

Barrett, T. V.; Freitas, R. A.; Albuquerque, M. I. C.; Guerrero, J. H. C (1996). Report on a collection of *Lutzomyia sandflies* (Diptera: Psychodidae) from the middle Solimões (Amazonas, Brazil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 27-35.

Barreto, M. P. (1943). Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). (Tese de Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 162p.

Barros, V.L.L.; Rebêlo, J. M. M. & Silva, F. S. (2000). Sandflies (Diptera, Psychodidae) in a secondary forest area in the county of Paço do Lumiar, Maranhão, Brazil: a leishmaniasis transmission area. *Cadernos de Saúde Pública* 6: 265–270.

Basano, S. A. & Camargo, L. M. A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana, histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7, 328-337.

Bastos, T. S. A. (2014). Espécies de Flebotomíneos e Ecoepidemiologia na cidade de Goiás-Go, Brasil.

Biancardi, C. M. B. & Castellón, E. G. (2000). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado do Mato Grosso, município de Chapada dos Guimarães, Brasil. *Acta Amazonica* 30, 115-128.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral. 2 ed. Brasília, 2006.

Brasil. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. 2 ed. Brasília 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Distribuição da Leishmaniose no Brasil. Brasília: MS, 2008.

Brazil, R. P. & Brazil, B. G. (2003). Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel, E. F. & Lainson, R. organizadores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 257-274.

Cantuária, M. F. (2012). Ecologia de culicídeos (Diptera: Culicidae) da área de proteção ambiental do Rio Curiaú, Macapá, Amapá. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Amapá. 64p.

Carvalho, M. R.; Valença, H. F.; Silva, F. J.; Pita-Pereira, D.; Araújo Pereira, T.; Britto, C. *et al.* (2010). Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropical* 116, 108-10.

Carvalho, B. M. (2011). Aspectos da ecologia de potenciais vetores de leishmanioses (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. 176p.

Casanova, C. (2001). A soil emergence trap for collections of Phlebotomine sand flies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 273-275.

Casanova, C.; Mayo, R. C.; Rangel, O.; Mascarini, L. M.; Pinatti, M. G.; Galati, E. A. B. & Gomes, A. C. (1995). Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 35, 77-84.

Castellon, E. G.; Araujo Filho, N. A.; Fé, N. F. & Alves, J. M. C. (1989). Flebótomos (Díptera: Psychodidae) no Estado de Roraima, Brasil. I. Espécies coletadas nas regiões Sul e Central. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84, 95-99.

Cerqueira, N. L. (1943). Um novo meio de montagem de lâminas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 36, 37-41.

Chagas, P. A.; Soares, D. C.; de Sousa, G. C. R.; Viana, R. B.; Rebelo, J. M. M e Garcez, L. M. (2016). Aspectos ecológicos da fauna de flebotomíneos em focos de leishmaniose na Amaônia Oriental, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazonica de Saúde* 7, 123-132.

Chang, M. C.; Teng, H. J.; Chen, C. F.; Chen, Y.C.; Jeng, C. R. (2008). The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal* 7, 100-105.

Chaniotis, B. N.; Correa, M. A.; Tesh, R. B. & Jonhson, K. M. (1971). Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotomine sandflies in Panama. *Journal of Medical Entomology*. 8, 415-420.

Dajoz, R. (1973). *Ecologia Geral*. 2 ed. Petrópolis: Vozes. Universidade de São Paulo.

Dantas-Torres, F. (2010). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba* 43, 733-736.

Dantas-Torres, F. & Brandão-Filho, S. P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, 151-156.

de Souza, A. A. A.; dos Santos, T. V.; Jennings, Y. L. L.; Ishikawa, E. A. Y.; Barata, I. R.; Silva, M. G. S.; Lima, J. A. N.; Shaw, J.; Lainson, R. & Silveira, F. T. (2016). Natural *Leishmania (Viannia) spp.* infections in phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon region reveal new putative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis. *Parasite* 23, 22.

Deane, L. M. & Deane, M. (1957). Observações sobre abrigos e criadouros de Flebotómos no noroeste do Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais* 9, 225-246.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 305-318.

Dias, E. S.; França-Silva, J. C.; Monteiro, E. M.; Paula, K. M.; Gonçalves, C. M. & Barata, R. A. (2007). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40, 4.

Dias Junior, M. G. S. (2008). Caracterização de espécies de *Leishmania* isolada de flebotomíneos sp. de três ecótopos da Serra dos Carajás, Pará, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 73p.

Dias-Lima, A., Bermúdez, E.C., Medeiros, J.F., Sherlock, I., (2002). Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 18, 823–832.

Dujardin, J. C. (2006). Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitology* 22, 4-6.

Farias, P. C. G. (2014). Análises de fatores geográficos e climáticos relacionados à distribuição de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em áreas de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Espírito Santo, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 93p.

Feliciangeli, M. D.(2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 2004;18:71-80.

Ferreira, L. V.; Muñoz, S. H.; Parolin, P. & Chaves, P. P. (2012). O efeito da fragmentação e isolamento florestal das áreas verdes da região metropolitana de Belém. *Pesqui Bot* 63, 357-367.

Ferreira, J. V. S.; Santos, T. V.; Santos, E. M & Gorayeb, I. S. (2014). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in forest fragments of Belém metropolitan area, Pará State, Brazil, with considerations on vectors of American cutaneous leishmaniasis agents. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 5, 29-35.

Ferreira, J. B. C. (2015). Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Matas de Galeria no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 42p.

Forattini, O. P. (1973). Subfamília Phlebotominae – Biologia. 4 ed. São Paulo: Edgar Blücher. In: *Entomologia Médica*. 119-197.

Forattini, O. P.; Rabello, E. X.; Serra, O. P.; Cotrim, M. D.; Galati, E. A. B. (1976) Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 10-13.

Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia Médica*. São Paulo: Edusp, v.2.

Furtado, N. V. R.; Galardo, A. K. R.; Galardo, C. D., Firmino, V. C. & 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*.

Galati, E. A. B. (2003). *Classificação de Phlebotominae*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 23-51.

Galati, E. A. B. (2008). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. (Tese de livre-docência). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública.

Garlapati, R. B. *et al.* (2012). Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu 49, 515-521.

Genaro, O.; Freitas, R. A.; Naiff, R. D.; Arias, J. R. (1986). Estratificação vertical de vetores da leishmaniose em floresta de terra firme, Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 19, 71-79.

Gontijo, C. M. F. & Melo, M. N. (2004). Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7, 338-349.

Grimaldi-Jr, G.; Momen, H.; Naiff, R. D.; McMahon-Prat, D. & Barret, T. V. (1991). Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies Amazon Region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44, 645-661.

Guia de Vigilância em Saúde (2016). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da saúde.

Haouas, N.; Pesson, B.; Boudabous, R.; Dedet, J. P. Babba, H. & Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of leishmania reservoir host by blood meal analysis in the vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 1054-1059.

Jeraldo V. L. S., Goes M. A. O.; Casanova, C., Melo, C. M., Araujo E. D., Filho, S. P. B., Cruz, D. E. R., Pinto, M. C. (2012). Sandfly fauna in area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45, 318-322..

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. 2015. Séries de dados históricos, estação 82121, Belém-PA.

Kent, R. & Norris, D. E. (2005). Identification of Mammalian Blood Meal in Mosquitoes by a Multiplex Polymerase Chain Reaction Targeting Cytochrome B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 226-342.

Killick-Kendric, R. (1990). Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 4, 1-24.

Killick-Kendrick, R. (1999) The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology* 17, 279-289.

Lainson, R.; Rangel, E. F. (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 811-827.

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 Royal Society Tropical Medicine and Higiene* 62, 385-395.

Lainson, R. & Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Volume I, Biology and Epidemiology*. London: Academic Press; p. 1-120.

Lainson, R.; Shaw, J. J (1998). New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier, Balows, Sussman (Eds). Topley & Wilson' S. Microbiology and Microbial Infectious Diseases. 9. ed. London: Arnold 5, 241-266.

Lainson, R. & Shaw, J. (2005). New World leishmaniasis. In: Cox FEG, Walkelin, D.; Gillespie, S. H.; Despommier, D. D. organizadores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial Infections: parasitology 10th ed. 313-349.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Ryan, L. & Silveira, F. T. (1985). Leishmaniasis in Brazil XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Transactions Royal Society Tropical Medicine and Higiene 79:223-226.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Silveira, F. T., de Souza, A. A.; Braga, R. R. & Ishikawa E. A. (1994). The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89, 435-443.

Lainson, R. (1983). The American Leishmaniasis: some observation on their ecology and epidemiology. Transactions Royal Society Tropical Medicine and Higiene 77, 569-596.

Lewis, D. J. (1974). The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 363-384

Lima, J. A. N.; Oliveira, D. M. S.; Brandao, R. C. F.; Silva, F. M. M.; Santos, L. A. S.; Pinheiro, M. S. B. *et al.* (2012) Epidemiological evaluation of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna in area of coverage in the field of Instituto Evandro Chagas, municipality of Ananindeua, Brazil. In: 28^o Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 39^o Annual Meeting on Basic

Research in Chagas Disease; 2012 out 1-3; Caxambu: Sociedade Brasileira de Protozoologia

Macedo, I. T. F.; Bevilaqua, C. M. L.; Morais, N. B.; Sousa, L. C.; Linhares, F. E.; Amora, S. S. A. & Oliveira, L. M. B. (2008). Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal* 18, 67-74.

Macedo, I. T. F.; Bevilaqua, C. M. L.; Morais, N. B.; Souza, L. C.; Linhares, F. E.; Amóra, S. S. A. & Oliveira, L. M. B. (2008). Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal* 18, 67-74.

Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. New Jersey.

Maroli, M. *et al.* (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, 27, 127-147.

Marzochi, M. C. A. (1992). Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 63, 82-104.

Marzochi, M. C. A. & Marzochi, K. B. F. (1994). Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Caderno de Saúde Pública* 10, 359-375.

Marzochi, M.C. A. & Marzochi, K. B. F. (1997). Leishmaniose em áreas urbanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30, 162-165.

Michalick, M. S. M.; Genaro, O. (2004). Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, D. P. Parasitologia Humana, 11 ed. São Paulo. Ed. Atheneu. p.67-83.

Michalsky, E. M.; Forte-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 sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 44, 255-259.

Miranda, D. E. O. (2015). Ecologia da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em uma área rural endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Pernambuco. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 69p.

Monteiro, C. C. (2012). O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela picada. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte.

Moraes, J. L. P.; dos Santos, C. L. C.; Bastos, V. J. C.; Pereira, A. C. N.; Moraes, L. S.; Moraes, J. R. L. & Rêbello, J. M. M. (2015). Vertical startificaion of sand flies (Diptera: Psychodidae) in riparian forest between the Amazon and northeast Brazil. Journal of Vector Ecology 40, 205-207.

Moschin, J. C. (2010). Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) do Parque Estadual da Cantareira (PEC) e Parque Estadual Alberto Löfren (PEAL) região metropolitana de São Pauli, Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 111p.

Motoie, G. (2013). Caracterização genotípica de *Leishmania (Leishmania) infantum* proveniente de cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Doenças da Secretária de Estado de Saúde de São Paulo. 148p.

Nadkarni, N. M. (1994). Diversity of species and interactions in the upper tree canopy of forest ecosystems. *American Zoology* 34, 70 - 78.

Oliveira, D. M. S (2009). Distribuição da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) ao longo de um gradiente rural-urbano em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Barcarena-PA, Brasil. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Pará. 103p.

Oliveira, D. M. S.; Saraiva, E. M.; Ishikawa, E. A. Y.; Sousa, A. A. A. M.; Silva, E. O. & Silva, I. M. (2010). Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 1039-1044.

Oliveira-Pereira, Y. N. O.; Rebêlo, J. M. M.; Moraes, J. L. P.; Pereira, S. R. F. P. (2006). Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 540-3.

Organização Mundial da Saúde (2005). Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>.

Paiva, B. R. (2009). Utilização da PCR na identificação de espécies de leishmânia e do hábito alimentar em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de

regiões do Mato Grosso do Sul, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Rangel, E. F. & Lainson, R. (2003). Ecologia das Leishmanioses. Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Rangel, E. F. & Lainson, R. Organizadores. Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: Fiocruz. p.291-336

Ready, P. D.; Lainson, R. & Shaw, J. J. (1983). Leishmaniasis in Brazil. XX: Prevalence of “enzootic rodent leishmaniasis” (*Leishmania mexicana amazonensis*) and apparent absence of pian-bois (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forests in eastern Amazonia. Transactions Royal Society Tropical Medicine and Higiene 77, 775-785.

Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review Entomology 58, 227-50.

Rocha, L. S.; Falqueto, A.; Santos, C. B.; Ferreira, A. L.; Graça, G. C.; Grimaldi-Jr, G. & Cupolillo, E. (2010). Suvervy of natural infection by Leishmanian in sand fly species colleted in southeastern Brazil. Transactions Royal Society Tropical Medicine and Higiene 104, 461-466.

Rodrigues, W. C. (2015). DivEs – Diversidade de Espécies v3.0 – Guia do Usuário. Entomologistas do Brasil. 33p. Disponível em <<http://dives.ebrasil.bio.br>>.

Rossi, E. *et al.* (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera,

Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica* 105, 158-165.

Rutledge, L. C. & Ellenwood, D. A. (1975). Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: the species complement. *Environmental Entomology*. 4, 71-77.

Ryan, L.; Silveira, F. T.; Lainson, R. & Shaw, J. J. (1984). Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajo, Pará State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 47-48.

Ryan, L. (1986). Flebotomos do Estado do Pará, Brasil (Diptera: Psychodidae). Belém: Instituto Evandro Chagas. 154 p. (Documento técnico; no. 1).

Sales, K. G. S. (2015). PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae). Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Recife. 68p.

Sanchez Clemente, N. et al.(2012). *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. *PloS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco 6, 1819

Sant'Anna, M. R.; Jones, N. G.; Hindley, J. A.; Mendes-Sousa, A. F.; Dillon, R. J.; Cavalcante, R. Alexander, B. & Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-capture *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropical* 107, 230-237.

Santos, T. V. (2011). Fotomicrografia digital para estudos taxonômicos de flebotomíneos do subgênero *Psychodopygus* do Estado do Pará - Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 108p.

Saraiva, L. (2015). Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Município de Belo Horizonte e no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais – Brasil. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. 129p.

Saraiva, L.; Reis, A. S.; Rugan, J. M. N.; Pereira, A. A. S.; Rêgo, F. D.; Lima, A. C. V. M.; Gontijo, C. M. F. & Andrade Filho, J. D. A. (2015). Suvery of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil. Plos One 10, 1-15.

Service, M. V. (1993). Mosquito Ecology: Field Sampling Methods, 2 ed. Elsevier Appl Sci Pub, London.

Shaw, J. (2008) How climatic and environmental variations affect the eco-epidemiology of the leishmaniasis and their control. In: III Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais; Recife (PE), Brasil. p. 13.

Sherlock, I. A. (2003). A importância dos flebotomíneos. In: Rangel, E. F. & Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil: Fiocruz, 15-21.

Shimabukuro, P. H. F. & Galati, E. A. B. (2011). Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. Biota Neotropica 11, 685-704.

Shimabukuro, P. H. F.; Tolezano, J. E. & Galati, E. A. B. (2011). Chave de identificação ilustrada dos Plebotominae (Diptera: Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. Papéis Avulsos de Zoologia 51, 399-441.

Shimabukuro, P. H. F.; Andrade, A. J.; Galati, E. A. B. (2017) Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. ZooKeys 660, 67-106.

Silva, A. C. (2013). Diversidade de gafanhotos (Orthoptera: Acridoidea) em dois fragmentos florestais no Espaço Urbano de Belém, Pará. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará

Silva, D. A. (2005). Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) e suas implicações na Epidemiologia das Leishmanioses em Cotia, Estado de São Paulo, Brasil (Dissertação de Mestrado). São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da USP.

Silveira, F. T.; Lainson, R.; Brito, A. C.; Oliveira, M. R. F.; Paes, M. G.; Souza, A. A. A. & Silva, B. M. (1997). Leishmaniose Tegumentar Americana. In Leão, R. N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP.

Silveira, F. T.; Ishikawa, E. A.; Souza, A. A. A. & Lainson, R. (2002) An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. Parasite 9, 43-50.

SINAN: Sistema de Informações e Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>
Acesso em 03 março. 2017

Souza, A. A. A.; Silveira, F. T.; Lainson, R.; Barata, R. I.; Silva, M. G. S.; Lima, J. A. N.; Pinheiro, M. S. B.; Silva, F. M. M.; Vasconcelos, L. S.; Campos, M. B. & Ishikawa, E. A. Y. (2010). Fauna flebotominica da Serra dos Carajás, Estado

do Para, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1, 45-51.

Sudia, W. A. & Chamberlain, R. W. (1962). Battery-operated light trap: an improved model. *Mosquitoes News*, Aliso Viejo, p.126-129.

Teodoro, U.; La-Salvia-Filho, V.; Lima, E. M.; Spinosa, R. P.; Barbosa, A. C.; Ferreira, M. E. M. C. & Lonardi, M. V. C. (1993). Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 27, 242-249.

Tesh, R. B. *et al.* (1972) Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore 20, 150-156.

Tesh, R. B. *et al.* (1972). Further studies on the natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore 95, 88-93.

Valinsky, L. *et al.* (2014). Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu 51, 678-685

Walsh, J. F.; Molyneux, D. H. & Birley, M. H. (1993) Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology* 106, 55-75.

Ward, R. D. (1977). New World leishmaniasis: a review of the epidemiological changes in the last three decades. *Proc XV Intl Congress Entomology in Washington*. p 505-522

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acessado em 10 de março de 2017.

Ximenes, M. F. F. M.; Silva, V. P. M.; Queiroz, P. V. S.; Rego, M. M.; Cortez, A. M.; Batista, L. M.M. *at al.* (2007). Flebotmíneos (Diptera, Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil: relexos do ambiente antrópico. *Neotropical Entomology* 36, 128-137.

Young, D. C. & Duncan, N. 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 Entomological Institute*, 54:1-881.

Young, D. G. (1979). A review of the bloodsucking Psychodid flies of Colombia (Diptera: Plebotominae and Sycoracinae). Gainesville, A. G. University of Florida, 226p.

Zeledon, R.; Murrillo, J. & Gutierrez, H. (1984). Observaciones sobre la ecologia de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existência de leishmaniasis visceral en Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79, 455-459.

Anexo I

1. Solução para maceração (Grinding Mix)

10X Grinding buffer (0,1 M Tris-HCL pH 7; 0,6 NaCl; 0,1 EDTA pH 8)

20X spermine/spermidine

10% Sucrose

Água destilada

2. Solução de SDS

2X SDS buffer (0,8 M Tris-HCL pH 9; 0,27 M EDTA)

10% Sucrose

10% SDS

Dietilpirocarbonato

3. Solução TE pH 8,0

10 mM Tris HCL

1 mM EDTA

4. Tampão TAE

40 mM Tris-acetato

1 mM EDTA