

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

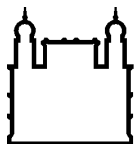
Mestrado em Biologia Parasitária

ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*
(ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)
PROCEDENTES DE ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL.

Daniel Motta da Silva

Rio de Janeiro

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DANIEL MOTTA DA SILVA

ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*
(ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)
PROCEDENTES DE ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL.

Dissertação apresentada à Coordenação de Pós-Graduação do Curso de Biologia Parasitária, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientadora

Dr^a Elizabeth Ferreira Rangel, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2010

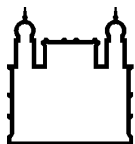
Motta-Silva, Daniel

ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES DE *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) PROCEDENTES DE ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NORTE E NORDESTE DO BRASIL./ Daniel Motta da Silva – Rio de Janeiro: 2010.

85 p;

Dissertação de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2010.

1. Phlebotominae; 2. *Lutzomyia whitmani*; 3. Complexo de espécies; 4. *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*; 5. *Leishmania* (*V.*) *shawi*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em biologia Parasitária

Daniel Motta da Silva

**ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*
(ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)
PROCEDENTES DE ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL.**

Orientadora:

Dr^a Elizabeth Ferreira Rangel, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Aprovada em: ____ de _____ de 2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
(Presidente)

Prof. Dra. Monique de Albuquerque Motta

Prof. Dra. Márcia Souto Couri

Rio de Janeiro
2010

Dedico

À pequena Lúcia.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Elizabeth Ferreira Rangel, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Serviço de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos e orientação;

Ao Dr. Octávio Fernandes, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos, orientação e suporte nas questões de biologia molecular.

Ao Prof. Maurício Luiz Vilela, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos sobre a taxonomia de flebotomíneos e pelo apoio e incentivo;

Ao Dr. Alfredo Carlos Rodrigues de Azevedo, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos sobre a taxonomia de flebotomíneos, pelo apoio e incentivo;

À Dr^a. Damar da Costa Pinto, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos e orientação sobre biologia molecular e pela amizade e incentivo;

Ao Dr. William Volino de Souza, da Universidade Estácio de Sá, pela amizade e orientação nas análises das sequências de DNA mitocondrial;

Ao Dr. Fernando Motta, do Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelo suporte para o seqüenciamento das amostras;

Ao Prof. Dr. Dário Eluan Kalume, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelos ensinamentos e apoio no preparo dos géis de poliacrilamida;

Ao Dr. Carlos Eduardo Almeida, do Laboratório de Biodiversidade Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pelo auxílio nas análises das sequências de DNA mitocondrial;

À Bióloga Nathália Motta Delvaux Ramos, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, pela amizade e todo apoio dado na realização dos experimentos;

Ao Prof. Andrey José Andrade, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ceder parte dos espécimes utilizados neste estudo;

A toda equipe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, em especial a Prof^a. Tainá Silva, Prof^a Nédia Saad Neemi, Dr^a Aline Cardoso Caseca Volotão, Lauren Hubert Jaeger pela amizade e apoio dado em diferentes etapas da realização deste trabalho;

A toda equipe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, em especial ao estudante de Iniciação Científica Rodrigo Espínula Godoy, ao Biólogo Antônio Marcus Grajauskas, ao Biólogo Bruno Moreira de Carvalho, à Prof^a. Cheryl Gouveia, à Prof^a. Margarete Martins dos Santos Afonso e à Prof^a. Simone Miranda da Costa pela amizade e apoio dado em diferentes etapas da realização deste trabalho;

Aos amigos e parceiros que apoiaram os trabalhos de campo, durante as coletas de flebotomíneos: Wagner A. Costa e Simone Miranda da Costa, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ; Iorlando da Rocha Barata, do Instituto Evandro

Chagas, Belém/PA; Lindemberg Caranha, da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará.

Aos meus amigos por escutarem minhas lamentações e por suas palavras de apoio durante a realização deste trabalho;

Aos Professores da Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRZ, que contribuíram muito para a minha formação;

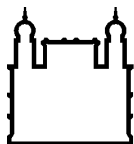
Aos amigos e colegas da Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRZ por participarem de um momento muito importante da minha vida;

Ao Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ pelo suporte financeiro e infra-estrutura para a realização deste estudo;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Edital MCT-CNPq / MS-SCTIE-DECIT – Nº 25/2006, processo: 410503/2006-1), pelo apoio financeiro.

*Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total,
buscar seu último limite e dar o melhor de si mesmo.
(Ayrton Senna da Silva)*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

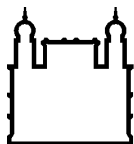
ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) PROCEDENTES DE ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniel Motta da Silva

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani é incriminado como vetor de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), associada à transmissão de duas leishmânias dermatrópicas: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*. No entanto, além da competência comprovada para transmitir dois parasitos, diferenças no comportamento entre populações geograficamente distintas têm sugerido que esta não seria uma única espécie e sim um complexo de espécies crípticas. A segura identificação destas populações é de fundamental importância para os estudos eco-epidemiológicos da LTA, possibilitando o entendimento dos ciclos de transmissão, uma vez que esta espécie ocorre na grande maioria dos estados brasileiros. No presente estudo foi avaliada a variabilidade genética de populações *L. (N.) whitmani* procedentes de Buriticupu (MA), área de transmissão de *Le. (V.) shawi* e *Le. (V.) braziliensis*, de Paragominas (PA), de transmissão de *Le. (V.) shawi*, e de Ilhéus (BA), localidade tipo, e de Meruoca (CE), áreas de transmissão de *Le. (V.) braziliensis*. A partir das análises por RAPD-PCR e sequenciamento do gene do Citocromo *b* foi possível observar três agrupamentos, onde os espécimes de Buriticupu e Paragominas compõem o mesmo grupo, os de Ilhéus formaram um segundo grupo e os de Meruoca o terceiro. As análises mostram um alto grau de diferenciação e sugerem que os três agrupamentos possam representar diferentes espécies crípticas do “complexo” *whitmani*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDIES ON SOME POPULATIONS OF *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (ANTUNES & COUTINHO, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) FROM TRANSMISSION AREAS OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN NORTH AND NORTHEAST BRAZIL.

ABSTRACT

DISSERTATION

Daniel Motta da Silva

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani is incriminated as vectors of leishmaniasis (ACL) associated with the transmission of two leishmania dermatropic: *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) shawi*. However, in addition to proven competence to transmit two parasites, differences in behavior between geographically distinct populations have suggested that this would not be a single species but a complex of cryptic species. The secure identification of these populations is of fundamental importance to the eco-epidemiological studies of LTA, allowing for better understanding of transmission cycles, since this species occurs in most Brazilian states. In this study we evaluated the genetic variability of populations *L. (N.) whitmani* coming Buriticupu (MA) transmission area of *Le. (V.) shawi* and *Le. (V.) braziliensis*, Paragominas (PA), transmission of *Le. (V.) shawi*, and Ilhéus (BA), type locality, and Meruoca (CE), transmission area of *Le. (V.) braziliensis*. From the analysis by RAPD-PCR and sequencing of the cytochrome b gene it was possible to observe three clusters, where the specimens Buriticupu and Paragominas comprise the same group, from Ilhéus formed a second group and from Meruoca of the third. The analysis shows a high degree of differentiation and suggests that the three groups may represent different cryptic species “whitmani complex”.

ÍNDICE

LISTA DE ANEXOS	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1 – INTRODUÇÃO	6
1.1 – AS LEISHMANIOSES	6
1.1.1 – Leishmaniose Visceral Americana	8
1.1.2 – Leishmaniose Tegumentar Americana	10
1.2 – OS FLEBOTOMÍNEOS	12
1.3 – A ESPÉCIE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	13
2 – JUSTIFICATIVA	21
3 – OBJETIVOS	22
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 – PROCEDÊNCIA DOS ESPÉCIMES DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	23
4.2 – CAPTURAS E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	27
4.3 – EXTRAÇÃO DE DNA	28
4.4 – ANÁLISE DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATOREAMENTE (RAPD-PCR)	29
4.4.1 – Padronização	29
4.4.2 – Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	29
4.4.3 – Análise por RAPD-PCR	30
4.4.3.1 – RAPD-PCR	30
4.4.3.2 – Visualização dos produtos amplificados.	30
4.4.3.3 – Análises dos dados de RAPD	31
4.5 – ANÁLISE DE DNA MITOCÔNDRIAL (Citocromo <i>b</i>)	31
4.5.1 – Visualização dos produtos amplificados	32
4.5.2 – Purificação das amostras	32
4.5.3 – Seqüenciamento do Citocromo <i>b</i>	32
4.5.4 – Análise das seqüências	33
5 – RESULTADOS	34
5.1 – ANÁLISES DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATOREAMENTE (RAPD/PCR)	34
5.2 – ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL (Citocromo <i>b</i>)	41
5.2.1 – Análise e definição dos haplótipos	41
5.2.2. – Diferenciação entre as populações.	47
5.2.3. – Genealogia das seqüências	48
6 – DISCUSSÃO	50
7 – CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	68

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Valor da distância p calculada entre os haplótipos de <i>L. (N.) whitmani</i> e demais espécies utilizadas como grupo externo.	67
Anexo 2	Matriz Binária construída a partir das análises dos géis de RAPD-PCR. Diferenciando os dados obtidos por cada <i>primers</i> .	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Distâncias entre as localidades estudadas. Valores expressos em quilômetros (Km). Dados obtidos pelo Google Earth [®] .	23
Tabela 4.2	Tabela indicando o total de espécimes capturados, identificados com extração de DNA e os utilizados nas análises.	26
Tabela 4.3	<i>Primers</i> para a análise de RAPD	28
Tabela 5.1	Matriz de similaridade baseada no coeficiente de Jaccard com base nos dados obtidos pelos <i>primers</i> 1, 3, 4 e 6. Matriz apresenta os valores de similaridade individuais para cada espécime de cada população. (1B, 2B, 3B = Buriticupu; 1M, 2M, 3M = Meruoca; 1I, 2I, 3I = Ilhéus; 1P, 2P, 3P = Paragominas).	38
Tabela 5.2	Amostras sequenciadas nas análises de DNA mitocondrial separadas por localidade. Amostras descartadas (*).	41
Tabela 5.3	Lista dos haplótipos de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> identificados neste estudo, especificando a amostra e o Município de captura.	42
Tabela 5.4	Sítios variáveis e as substituições ocorridas entre os haplótipos de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> .	44
Tabela 5.5	Mutações observadas na sequência de aminoácidos do citocromo b nos diferentes haplótipos.	45
Tabela 5.6	Polimorfismos no gene mitocondrial do Citocromo b em associação a localização geográfica das populações de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> .	46
Tabela 5.7	Valores de diferenciação entre as populações estimados por <i>F_{st}</i> .	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Representação esquemática do mapa do Brasil mostrando os locais de coletas das populações estudadas de <i>Lutzomyia (Nyssomya) whitmani</i> Antunes & Coutinho, 1939. O quadro evidencia a posição geográfica do Brasil na América do Sul.	24
Figura 4.2	Imagem de satélite da costa brasileira evidenciando as localidades estudadas. Imagem obtida pelo Google Earth®.	25
Figura 5.1	Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs de <i>L. (N.) whitmani</i> das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo <i>primer</i> 1, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).	35
Figura 5.2	Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs <i>L. (N.) whitmani</i> das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo <i>primer</i> 3, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).	36
Figura 5.3	Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs <i>L. (N.) whitmani</i> das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo <i>primer</i> 4, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população e ainda um fragmento comum a todas. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).	37
Figura 5.4	Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs <i>L. (N.) whitmani</i> das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo <i>primer</i> 6, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).	38
Figura 5.5	Dendograma das distâncias genéticas individuais das populações de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> , Buriticupu (MA), Meruoca (CE), Paragominas (PA) e Ilhéus (BA), gerado a partir da análise dos <i>primers</i> 1, 3, 4 e 6, mostrando um agrupamento correlacionado com a localização de cada população. Os números representam os valores de <i>bootstraps</i> baseados em 1000 réplicas.	40
Figura 5.6	Mapa indicativo da localização geográfica dos haplótipos de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> obtidos nesse estudo. Nomes dos haplótipos estão indicados dentro dos balões próximos a indicação da localidade.	44
Figura 5.7	Árvore de distância entre os haplótipos de <i>Lutzomyia (N.) whitmani</i> construída pelo método de <i>Neighbor-joining</i> utilizando os 316 pb finais do gene Citocromo <i>b</i> . As sequências de <i>L. hernandezi</i> e <i>L. panamensis</i> são utilizadas como grupo externo. Os números dados aos nós são os valores de <i>bootstrap</i> calculados a partir de 1.000 replicações. Os retângulos pontilhados marcam os três principais agrupamentos encontrados.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
BSA	Albumina sérica bovina
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LTA	Leishmaniose Tegumentar americana
LVA	Leishmaniose visceral americana
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RAPD	<i>Random Amplified polymorphism DNA</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tampão TBE	Tampão tris-borato-EDTA

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são consideradas, num conceito mais clássico, como zoonoses causadas por parasitos flagelados heteroxenos do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Rey 2001). Contudo, como protozooses humanas, têm despertado atenção especial devido a sua importância médica e econômica, com distribuição geográfica envolvendo diferentes Continentes tais como África, América, Ásia, Europa e Oceania (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS – 29/10/2008 – http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/em/index.htm) estimou em 2008 que as leishmanioses estão presentes em 88 países, ocorrendo a notificação compulsória em apenas 30 deles. A prevalência é de cerca de dois milhões de novos casos estimados anualmente, com aproximadamente, 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. Nas Américas, estima-se sua distribuição em larga escala. No entanto, uma avaliação mais precisa torna-se impossível por não ser uma enfermidade de notificação compulsória em todos os países.

As leishmânias são protozoários que têm seu ciclo de vida associado a dois hospedeiros: os vertebrados, onde vivem sob a forma amastigotas, nas células do sistema fagocítico mononuclear de alguns órgãos, e os invertebrados (flebotomíneos vetores), onde se desenvolvem e se multiplicam no tubo digestivo (Grimaldi & Tesh 1993).

Os reservatórios das espécies de leishmânias são, principalmente, mamíferos silvestres pertencentes às ordens Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla, que participam do ciclo primário (silvestre) de transmissão, servindo como fonte de infecção para flebotomíneos (Lainson & Shaw, 1998).

Contudo, sugere-se que alguns animais domésticos (cães e eqüinos), em determinadas situações, sejam responsáveis pela manutenção dos ciclos peridoméstico e urbano, onde as espécies de flebotomíneos vetores estariam adaptadas ao ambiente domiciliar e/ou peridomiciliar (Lainson & Shaw 1998, Rangel *et al.* 1990, Rangel 1995, Brasil 2007)

As leishmanioses, no Novo Mundo, estão divididas em Leishmaniose Tegumentar Americana, que apresenta um padrão diferenciado de manifestações clínicas (cutânea e mucosa), e Leishmaniose Visceral Americana, cujo tropismo do parasito pelo sistema fagocítico mononuclear do baço e do fígado acarreta a hiperplasia e hipertrofia desses órgãos (Brasil 2006, 2007).

No Brasil, as leishmanioses estão incluídas no quadro das grandes endemias, pertencendo à lista do Sistema Nacional de Informação de Doenças de Notificação Compulsória (SINDC), do Ministério da Saúde. Estando presentes em todas as Unidades Federadas (Brasil 2006, 2007).

A incidência das leishmanioses no Brasil vem crescendo em várias regiões do país, ao mesmo tempo em que apresentam mudanças em seu quadro epidemiológico (Lainson 1983, 1988, Lainson *et al.* 1994, Rangel 1995, Brasil 2006, 2007). Nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, vêm sendo descritos novos perfis epidemiológicos, ocorrendo, em muitos casos, a transmissão no ambiente domiciliar, sendo facilmente observada a presença destes agravos na periferia de grandes cidades, onde a vegetação primária vem sendo destruída, ou até mesmo em áreas metropolitanas, inclusive com a presença do vetor no ambiente urbano (Brasil 2006, 2007, Rangel & Vilela 2008, Rangel & Lainson 2009).

1.1.1 – Leishmaniose Visceral Americana

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) tornou-se uma das doenças mais importantes da atualidade, devido a sua incidência e alta letalidade, sobretudo em indivíduos não tratados e crianças desnutridas. Além disso, é considerada emergente em indivíduos portadores de infecção pelo vírus de imunodeficiência adquirida (HIV). Com comprometimento do fígado, do baço, da medula óssea e dos tecidos linfóides pode progredir para um quadro bastante grave e, se não tratada precocemente evolui para o óbito (Brasil 2006).

Na América Latina, a doença já foi descrita em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (Brasil 2006).

Esta doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, como resultado gradativo das alterações do meio ambiente, particularmente associados aos processos de urbanização desordenada. Os dados epidemiológicos das últimas décadas apontam a urbanização e periurbanização da LVA, destacando-se surtos em cidades como Santarém (PA), Corumbá (MS), Natal (RN), São Luiz (MA), Teresina (PI), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Rio de Janeiro (RJ), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO), com cerca de 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (Brasil 2006). Recentemente, a doença foi detectada na Região Sul, em São Borja, RS (Comunicação pessoal, Edmilson Santos, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul).

A LVA, inicialmente associada ao ambiente rural e periferia das grandes cidades, tem apresentado perfis de transmissão diferenciados. Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil 2003, 2006), podem ser definidos dois padrões epidemiológicos para a LVA: (1) padrão clássico, associado ao ambiente rural, periferia das grandes cidades, presença de baixo nível sócio-econômico e pobreza; (2) padrão recente, encontrado no ambiente urbano, em cidades de médio e grande porte, principalmente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e em alguns Estados do Nordeste. O Programa de Controle da Leishmaniose

Visceral, do Ministério da Saúde, para melhor desenvolver as ações preconizadas, classifica, ainda, os municípios como áreas de transmissão esporádica, moderada ou intensa (Brasil 2006).

O agente etiológico da LVA no Continente Americano é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, cujo vetor principal é *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, espécie altamente adaptada ao ambiente urbano e que reúne fortes evidências quanto à sua competência vetorial (Deane 1956, Lainson *et al.* 1977, 1990, Lainson & Shaw 1979, Ryan *et al.* 1986, Lainson & Rangel 2003, 2005).

Uma situação diferenciada, com relação à transmissão da LVA, observa-se na região central do Brasil. Em 1985, Galati *et al.* sugeriram que *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* Gonzalez & Garcia, 1981 estaria envolvido com a transmissão de LVA em Corumbá e Ladário (MS), por sua antropofilia, alta densidade e pela ausência de *L. (L.) longipalpis* nas áreas de transmissão. Em 1998, Santos *et al.* relataram o achado de infecção natural em *L. (L.) cruzi*. Recentemente, Missawa & Lima (2006) e dados da Secretaria Estadual de Mato Grosso apontam evidências da participação de *L. (L.) cruzi* na transmissão da LVA no município de Jaciara (MT).

Recentemente, *Lutzomyia migonei* França, 1920 vem sendo sugerida como potencial transmissor da *L. (L.) infantum chagasi*, no Estado de Pernambuco, pelo achado de infecção natural deste flebotomíneo em área de transmissão de LVA, onde já havia sido relatado como predominante no ambiente domiciliar (intra e peridomicílio); os autores destacam a ausência de *L. longipalpis* na região (Carvalho *et al.* 2010). Na Argentina, em La Banda, estudos propõem que *L. migonei* participaria de um ciclo enzoótico, com transmissão humana acidental (Salomon *et al.* 2010).

No ambiente silvestre, os reservatórios da LVA são as raposas (*Dusicyon vetulus* (Carnivora: Canidae) e *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora: Canidae); no Brasil já foram encontradas raposas infectas no Nordeste, Sudeste e região Amazônica. Já na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é tido como principal fonte de infecção para os flebotomíneos (Deane 1956, Lainson & Shaw 1998, Lainson & Rangel 2003, 2005, Brasil 2006).

Possivelmente, os marsupiais (*Didelphis albiventris*), também poderiam desempenhar o papel de reservatórios na cadeia epidemiológica da LVA (Brasil 2006). Afonso (2008), em estudos realizados com o teste imunoenzimático ELISA, detectou sangue de gambá em espécimes de *L. (L.) longipalpis* procedentes de Sobral e Massapê (CE) e Jequié (BA). Este dado deve ser analisado com atenção, pois o gambá, *Didelphis albiventris*, foi sugerido como possível reservatório de *L. (L.) infantum chagasi*, a partir de isolados obtidos em Jacobina (BA): 2 de 84 gambás estavam positivos (Sherlock *et al.* 1984, 1988). Posteriormente, outros estudos relataram a infecção natural de *Didelphis marsupialis*, por *Leishmania* spp., possivelmente *L. (L.) infantum chagasi*, discutindo o papel deste mamífero como potencial reservatório para a LVA (Cabrera *et al.* 2003, Schallig *et al.* 2007).

1.1.2 – Leishmaniose Tegumentar Americana

Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Brasil 2007), pode-se definir a LTA como uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e mucosas. Casos humanos têm sido registrados com diferentes formas clínicas que incluem desde lesão cutânea localizada, múltiplas lesões (forma disseminada), nodulações não ulceradas (cutânea difusa) e comprometimento de mucosa (Brasil 2007).

A LTA possui ampla distribuição no Continente Americano, havendo registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. No Brasil, sua transmissão é descrita em diversos municípios de todas as unidades federadas (Brasil 2007).

Atualmente, a LTA no Brasil está categorizada em três padrões epidemiológicos (Brasil 2007): (1) silvestre – onde a transmissão ocorre em área de vegetação primária, e neste caso a doença é exclusivamente caracterizada como uma zoonose de animais silvestres, podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ambiente silvestre onde esteja ocorrendo a enzootia; (2) surto

epidêmico (padrão de áreas impactadas; ocupacional e lazer) – está associado à exploração desordenada da floresta e a derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo; (3) rural e periurbano em áreas de colonização – relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados na periferia de centros urbanos sempre associados a matas secundárias ou residuais, aparentemente sem correlação com derrubadas de matas. Neste padrão de transmissão cães, eqüinos e roedores são sugeridos como reservatórios.

A LTA é uma doença com diversidade de agentes etiológicos, reservatórios e vetores que determinam diferentes ciclos de transmissão em nichos ecológicos restritos. É causada por leishmânias dermatrópicas dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo três de maior importância epidemiológica no Brasil: *Leishmania (V.) braziliensis*, a de mais ampla distribuição, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (Rangel 1995, Lainson & Shaw 1998, Rangel e Lainson 2009).

As leishmânias do subgênero *Viannia* têm sua transmissão associada com *Lu. (Nyssomyia) intermédia* Lutz & Neiva, 1920, *Lu. migonei* França, 1920 (Grupo Migonei), *Lu. (Pintomyia) fischeri* Pinto, 1926, *Lu. (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Frailha, 1973, *Lu. (Psychodopygus) wellcomei* Frailha, Shaw & Lainson, 1971, *Lu. (Psychodopygus) complexa* Mangabeira, 1941, *Lu. (Psychodopygus) ayrozai* Barreto & Coutinho, 1940, *Lu. (Psychodopygus) paraensis* Costa Lima, 1941, *Lu. (Psychodopygus) squamiventris* Lutz & Neiva, 1912, *Lu. (Trichophoromyia) ubiquitalis* Mangabeira 1941, *Lu. (Nyssomyia) antunesi* Coutinho, 1939, *Lu. (Viannamyia) tuberculata* Mangabeira, 1941, *Lu. (Nyssomyia) whitmani* Antunes & Coutinho, 1939 e *Lu. (Nyssomyia) neivai* Pinto, 1926 (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2009, Pita-Pereira *et al.* 2009).

Para o subgênero *Leishmania*, como principal transmissor da *Leishmania (L.) amazonensis*, destaca-se *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2009).

Já foram registrados infecções por LTA em algumas espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, sendo o papel, destes últimos, como

reservatórios ainda não bem definido. Como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais das leishmânias dermatrópicas destacam-se algumas espécies de mamíferos silvestres, tais como as preguiças (*Choloepus didactylus*), tamanduás (*Tamandua tetradactyla*), roedores (*Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Proechymis*), primatas (*Cebus apella*), dentre outros (Lainson & Shaw 1998, Brandão-Filho *et al.* 2003). São numerosos os registros de infecção em animais domésticos (especialmente cães e eqüinos) e que em algumas situações são sugeridos como reservatórios, embora não hajam comprovações científicas que determinem o papel destes animais como fontes de infecção para os flebotomíneos (Lainson & Shaw 1998 Rangel & Lainson 2003, Brasil 2007).

1.2 – OS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são dípteros, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Young & Duncan 1994). São insetos de pequeno porte, medindo cerca de 3 a 5 mm de comprimento. Os adultos são facilmente reconhecidos por apresentarem, em repouso, as asas mantidas de forma divergentes, em posição semi-ereta. Possuem o corpo densamente revestido por cerdas finas; as pernas são compridas e finas (Forattini 1973).

São insetos criptozoários são holometábolos, cujo ciclo biológico é representado pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos. As formas imaturas terrestres desenvolvem-se em ambiente quente e úmido alimentando-se de matéria orgânica em decomposição, preferencialmente vegetal (Forattini 1973).

Adultos, machos e fêmeas necessitam de carboidratos, como fonte de energia; na natureza alimentam-se de seivas vegetais, ou ainda da secreção de afídeos (“honeydew”) (Forattini 1973, Killick-Kendrick 1979, Brazil & Brazil 2003). Apenas as fêmeas dos flebotomíneos praticam a hematofagia, desempenhando um papel importante na ovogênese. Algumas espécies são dotadas de notável grau de antropofilia, o que as confere um importante papel na veiculação de patógenos

humanos; possuem hábitos crepusculares e/ou noturno na sua grande maioria (Forattini 1973, Brazil & Brazil 2003).

No Brasil são conhecidos popularmente como mosquito-palha, cangalhinha, tatuquira, anjinho e asa dura (Rey 2001, Brasil 2003, 2007).

Segundo Young & Duncan (1994), são considerados na subfamília Phlebotominae, três gêneros para o Novo Mundo: *Lutzomyia* França, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948. No Velho Mundo, igualmente, são aceitos três gêneros: *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987. Existem cerca de 900 espécies conhecidas de flebotomíneos, sendo que, destas aproximadamente 500 foram descritas no continente Americano. No entanto, apenas algumas espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são incriminadas como vetoras de leishmanioses (Lewis & Ward 1987, Young & Duncan 1994, Rangel & Lainson 2003, 2009). Galati (2003) apresentou uma classificação taxonômica para flebotomíneos, do Continente Americano, baseada no processo filogenético.

Aspectos detalhados da morfologia deste grupo de insetos podem ser observados nos trabalhos de Young & Duncan (1994) e de Galati (2003).

1.3 – A ESPÉCIE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939)

Este flebotomíneo, pertencente ao subgênero *Nyssomyia*, foi registrado em todas as regiões geográficas do Brasil e no Continente Americano foi assinalado na Argentina, na Guiana Francesa e no Paraguai (Young & Duncan 1994, Rangel & Lainson 2003, Costa 2005).

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani, inicialmente foi denominada como *Flebotomus whitmani*, segundo Antunes e Coutinho (1939), como homenagem ao Dr. Whitman, da Fundação Rockefeller (Rangel & Lainson 2003). Foi descrita com

base nas observações de exemplares machos e fêmeas coletados em Ilhéus, Estado da Bahia (BA).

Em recente revisão sobre os potenciais vetores de LTA no Brasil (Rangel & Lainson 2009) aspectos sobre os hábitos e habitats de *L. (N.) whitmani* foram descritos para as diferentes regiões geográficas, além de serem apresentadas considerações relativas à competência deste flebotomíneo como transmissor de duas leishmânias dermatrópicas.

No sudeste do Brasil, os primeiros estudos sobre a biologia de *L. (N.) whitmani* foram realizados por Barretto (1943). Foi considerada como uma espécie silvestre, embora pudesse ser encontrada no interior de casas situadas próximo ou dentro da mata; apresentava o hábito, ao entardecer, de picar o homem e cães e apresentou-se com grande freqüência e densidade em galinheiros; ainda foi sugerido que a alta densidade populacional próximo a áreas desmatadas se dava pela grande variedade de fontes alimentares disponíveis. Forattini (1943, 1960), também em São Paulo, verificou a presença do flebotomíneo nas proximidades de abrigos de animais domésticos e alta densidade nos domicílios. De um modo geral, os estudos realizados em outros Estados do Sudeste, revelam o mesmo padrão e comportamento para *L. (N.) whitmani* (Rangel & Lainson 2009).

No Rio de Janeiro a presença deste flebotomíneo foi registrada em áreas residenciais próximas a mata, onde poderia ocorrer em simpatria com *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, praticando antropofilia no ambiente peridomiciliar (ambiente onde esta espécie é mais frequente) (Rangel *et al.* 1986, 1990, Oliveira *et al.* 1995, Souza *et al.* 2001). Dados semelhantes em relação à antropofilia e habitats puderam ser constatados em estudos conduzidos em Minas Gerais (Mayrink *et al.* 1979, Passos *et al.* 1991).

Em alguns estudos feitos no Nordeste, especialmente na Bahia e no Ceará *L. (N.) whitmani* apresentou um comportamento semelhante ao observado no Sudeste e Sul do Brasil: elevada antropofilia e adaptação ao ambiente domiciliar (Barretto *et al.* 1982, Vexenat *et al.* 1986, Azevedo & Rangel 1991, França *et al.* 1991, Brazil *et al.* 1991).

Sobre a sazonalidade, pequenas diferenças na densidade deste flebotomíneos podem ser observadas nas diferentes regiões do Brasil, provavelmente devido às variações nas condições climáticas. Porém, de modo geral, nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul, foi relatada a presença de *L. (N.) whitmani* em todos os meses do ano, com maior frequência nos meses mais frios (Barretto 1943, Azevedo & Rangel 1991, Souza *et al.* 2002).

O hábito alimentar de *L. (N.) whitmani* segue o padrão usual dos flebotomíneos (Forattini 1973). No Nordeste a espécie pode ser capturada picando durante o período da madrugada, entre 01:00h e 03:00h (Azevedo & Rangel 1991). No Rio de Janeiro, a antropofilia praticada no peridomicílio se deu principalmente entre 04:00h e 06:00h (Souza *et al.* 2005). Estudos realizados por Teodoro *et al.* (1993), no Paraná, revelaram que *L. (N.) whitmani* é oportunista, resultado da grande variedade de hospedeiros no peridomicílio.

Na Amazônia, as pesquisas registram um padrão comportamental diferenciado, daquele observado para *L. (N.) whitmani* em outras regiões brasileiras, como já relatado anteriormente. As primeiras investigações sobre o comportamento da espécie na Amazônia foram conduzidas por Lainson e Shaw (1979) que apontaram esse flebotomíneo como silvestre, podendo ser coletado na base do tronco e, principalmente, na copa das árvores de grande porte, associado a animais silvestres e apresentando pouca tendência antropofílica. Outros estudos confirmaram tais observações e sugeriram que a prática da antropofilia somente ocorreria em condições especiais (Ready *et al.* 1986, Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003). Campbell-Lenrum *et al.* (1999) analisando espécimes procedentes do Pará, Paraná, Pernambuco e Piauí, afirmaram não terem encontrado significativa diferença quanto à antropofilia de populações de *L. (N.) whitmani*, contestando as informações anteriores a respeito aos hábitos alimentares desta espécie na Amazônia, que não a consideravam antropofílica.

Com relação à participação de *L. (N.) whitmani* na cadeia epidemiológica da LTA no território brasileiro, o primeiro relato sugerindo seu papel como vetor foi no Estado de São Paulo, quando a espécie foi encontrada infectada por flagelados, possivelmente *Leishmania* (Pessoa & Coutinho, 1941). Estes mesmos autores, ainda em 1941, relataram que *L. (N.) whitmani* de fato reunia comportamento típico

de um vetor, antropofilia e frequência nas residências. Segundo Forattini (1973), durante o processo de colonização das regiões Sul e Sudeste, nas décadas de 30 e 40, a transmissão de LTA esteve associada a *L. (N.) whitmani*, que habitava o ambiente silvestre. Estudos posteriores em São Paulo, no Município de São Roque, área endêmica de LTA por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, mostraram a predominância de *L. (N.) whitmani* e o sugeriram como possível vetor local (Taniguchi *et al.* 1991).

Outras pesquisas no Sudeste sugerem a participação de *L. (N.) whitmani* na transmissão da LTA em Caratinga, Minas Gerais e na região montanhosa de Afonso Cláudio, Espírito Santo (Mayrink *et al.* 1979, Falqueto 1995). Souza *et al.* (2001, 2002) sugeriram que *L. (N.) whitmani* poderia estar compartilhando o papel de vetor de *Le. (V.) braziliensis* com *L. (N.) intermedia* num mesmo nicho ecológico em áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro. Recentemente, Carvalho *et al.* (2008) identificam por PCR, um espécime de *L. (N.) whitmani* infectado por *Leishmania* do subgênero *Viannia* numa região próxima a Belo Horizonte (MG), sugerindo que esta espécie poderia ser o vetor da LTA na região.

Na Região Sul, a espécie tem um papel destacado na transmissão de LTA, especialmente no Paraná, onde foi encontrada com infecção natural por *Le. (V.) braziliensis*, além de ser antropofílica e ocorrer em alta densidade (Luz *et al.* 2000, Teodoro *et al.* 2003)

Na Região Centro-Oeste, as pesquisas no Estado do Mato Grosso do Sul, apontam várias evidências sugerindo a importância de *L. (N.) whitmani* na transmissão de *Le. (V.) braziliensis*: o achado de infecção natural, a antropofilia, sua ocorrência nos sítios de transmissão, bem como seu registro em diferentes ecótopos, quer seja em áreas de vegetação preservada ou que sofreram alterações ambientais (Nunes *et al.* 1995, Galati *et al.* 1996, Dorval *et al.* 2009). Dados recentes do Estado de Mato Grosso sugerem *L. (N.) whitmani* como vetor de LTA em aldeias indígenas (Maciel & Missawa 2009).

No Nordeste, na grande maioria das áreas de transmissão de LTA, especialmente tomando em conta os estudos realizados no Ceará e na Bahia, *L. (N.) whitmani* é considerada como principal vetor por apresentar características

essências associadas à competência vetorial: o encontro de espécimes naturalmente infectados por *Le. (V.) braziliensis*, elevada antropofilia e distribuição espacial coincidente com a das áreas de transmissão (Hoch *et al.* 1986, Ryan *et al.* 1990, Azevedo *et al.* 1990, Azevedo & Rangel 1991, Queiroz *et al.* 1994). Da mesma forma, as investigações feitas na “Zona da Mata”, em Pernambuco, sugerem *L. (N.) whitmani*, como importante vetor de LTA (Brandão-Filho *et al.* 1994).

No município de Buriticupu, Amazônia Maranhense, Costa *et al.* (1998) registraram casos humanos de LTA, determinados por *Le. (V.) brasiliensis* e *Leishmania. (Viannia) shawi*. Estudos sobre a fauna flebotomínica da região, sugeriram que *L. (N.) whitmani* seria o vetor envolvido na transmissão das duas leishmânias dermatrópicas, já que pode ser coletado no peridomicílio e na mata, no primeiro ambiente mais frequentemente no crepúsculo vespertino, quando moradores se encontram ao redor de suas residências, e dentro da mata em horários noturnos, em que caçadores normalmente exercem suas atividades (Rebêlo *et al.* 2000). Outro dado importante refere-se ao fato de que este flebotomíneo está presente em todos os meses do ano, com densidade considerável (Rebêlo *et al.* 2001).

Segundo Rebêlo *et al.* 2009, a ocorrência de *L. (N.) whitmani* em diferentes fitorregiões do Estado do Maranhão, nas áreas rurais e urbanas favorece a transmissão da LTA nos diversos ambientes. Estes autores sugerem ainda que *L. (N.) whitmani* possivelmente transmita *Le. (V.) shawi* no lado amazônico e *Le. (V.) braziliensis* no lado nordestino do Maranhão.

Na Amazônia, mais precisamente no Pará, um parasito isolado de *L. (N.) whitmani* foi caracterizado como *Leishmania (Viannia) guyanensis*, sugerindo este flebotomíneo como mantenedor da enzootia silvestre desta leishmânia (Lainson *et al.* 1979). Em 1989, Lainson *et al.* puderam isolar outra leishmânia deste flebotomíneo e a caracterizaram como *Le. (V.) shawi*; considerando que tal infecção ocorre com frequência neste flebotomíneo, os autores supõem que o parasito anteriormente caracterizado como *Le. (V.) guyanensis*, na verdade tratava-se de *Le. (V.) shawi*.

Nos Municípios de Rio Branco, Bujari e Xapuri, Estado do Acre, estudo sobre a fauna flebotomínica e potenciais vetores de LTA apontam *L. (N.) whitmani* como a espécie mais abundante, com distribuição espacial coincidindo com os locais com transmissão de *Le. (V.) braziliensis* sendo, portanto, sugerida como provável vetor do parasito na região (Azevedo *et al.* 2008). Da mesma forma, no Estado de Tocantins, onde cerca de 95% dos municípios ocorre transmissão de LTA, *L. (N.) whitmani* é considerada como potencial vetor de *Le. (V.) braziliensis*, já que é um flebotomíneo registrado em praticamente todas as áreas de ocorrência de transmissão da doença, especialmente aquelas com forte impacto ambiental (Vilela *et al.* 2008).

Atualmente, pode-se admitir *L. (N.) whitmani* como o vetor mais importante de LTA no Brasil, tendo sido registrada a sua ocorrência na maioria dos circuitos epidemiológicos de LTA, estando associado com grande diversidade de vegetação (Costa *et al.* 2007). Aspectos diferenciados da ecologia, em conjunto com mudanças climáticas, provavelmente desempenham um papel importante para a disseminação da LTA no Brasil nos últimos anos (Shaw, 2007) e, neste contexto, *L. (N.) whitmani* parece ser o flebotomíneo que melhor se adapta a novos ambientes, em associação com o homem e animais domésticos nas áreas rurais e periurbanas (Costa *et al.* 2007, Shaw 2008).

Peterson e Shaw (2003) trabalhando com análise de modelagem de nicho ecológico puderam estimar no Brasil e em outros países do Continente Americano a dispersão e adaptação de *L. (N.) whitmani* frente a mudanças climáticas globais, pela grande capacidade de se adaptar a ambientes modificados.

A partir da hipótese levantada por Lainson (1988) de que *L. (N.) whitmani* representaria um complexo de espécies crípticas de dois ou mais táxons, com base nas evidências de comportamento e habitats tão diferenciados, muito se tem discutido acerca da identidade taxonômica deste flebotomíneo.

Rangel *et al.* (1996) através da análise de caracteres morfológicos e morfométricos de quatro populações, indicaram a existência de duas linhagens de *L. (N.) whitmani* no Brasil: uma Amazônica, presente ao Norte e ao Sul do Rio Amazonas, no Estado do Pará, e a outra ocorrendo no Nordeste, nos estados do

Ceará e Bahia (Ilhéus – localidade tipo). O estudo morfométrico detectou diferenças significativas para onze caracteres morfológicos, incluindo o filamento genital e a relação filamento-bomba ejaculadora, onde o comprimento é consistentemente reduzido nos espécimes da Amazônia. Foram extraídos fragmentos de DNA genômico de espécimes de uma população do Pará e utilizados no preparo de sondas e, em hibridizações, apenas as populações da Amazônia revelaram fortes sinais de reconhecimento. No entanto, mesmo perante tais evidências, os autores não descartaram a possibilidade da existência de um cline.

Em 1997, Ready *et al.* caracterizaram populações de *L. (N.) whitmani* de diversas localidades comparando seqüências de DNA mitocondrial. Os 16 haplótipos da análise filogenética confirmaram a existências de uma linhagem na Região Amazônica e uma na Região Nordeste, tal como Rangel *et. al* (1996) haviam discutido anteriormente. Uma terceira linhagem foi identificada no interior semi-árido do país e foi denominada Norte-Sul. Continuando essa linha de estudo, Ready *et. al.* (1998) demonstraram uma relação entre a existência das três linhagens e três zonas bioclimáticas: a linhagem Amazônica estaria associada à Floresta Tropical Amazônica, a do Nordeste associada ao Cerrado do interior do País e a Norte-Sul associada à Floresta Tropical Atlântica. Essas zonas bioclimáticas existem entre 2 e 3 milhões de anos, portanto, baseado no “relógio molecular” do DNA mitocondrial dos flebotomíneos, subentende-se que as linhagens coexistem nessa mesma datação (Ready *et al.* 1998).

Ishikawa *et al.* (1999) analisaram populações das Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul indicando a existência de um clado de Rondônia (RO) dentro da linhagem de áreas florestais, que incluíram haplótipos da Amazônia e Mata Atlântica e Ilhéus (localidade-tipo). Os autores concluíram que estes resultados seriam evidências da ocorrência de uma migração recente entre as áreas de floresta.

Margonari *et al.* (2004) avaliaram a variabilidade genética de quatro populações de *L. (N.) whitmani* provenientes de áreas endêmicas de LTA no Brasil. Análises moleculares mostraram uma alta variabilidade intrapopulacional. Foi observada uma maior similaridade entre as populações de Ilhéus (BA), Corte de Pedra (Bahia) e Serra de Baturité (CE) formando um grupo, enquanto Martinho Campos (MG) em um segundo grupo, sugerindo dois clusters de populações

biogeográficas. Estes dados corroboram com estudos morfométricos realizados nas mesmas regiões, sendo um suporte adicional para sustentar a existência de pelo menos dois agrupamentos de populações biogeográficas de *L. (N.) whitmani* no Brasil.

Estudos feitos com quatro populações de *L. (N.) whitmani*, oriundas dos Municípios de Santarém e Paragominas, Estado do Pará, Ilhéus, Estado da Bahia, e Londrina, Estado do Paraná, verificaram baixa distância gênica entre as populações analisadas, indicando que estas seriam geneticamente similares. Contudo chamou atenção o grau de diferenciação entre a população de Paragominas e as demais. A análise de estruturação gênica revelou um excesso de homozigotos (Costa 2005).

Ainda, sobre *L. (N.) whitmani* Mazzoni *et al.* (2006) analisaram a variação do gene *period* em cinco populações deste vetor e *L. (N.) intermedia* do sudeste e nordeste. Testes de fluxo gênico sugeriram a ocorrência de introgressão entre as duas espécies, o que foi confirmado em uma análise multilocus (Mazzoni *et al.* 2008).

2 – JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar América (LTA) é uma doença, amplamente distribuída na América Latina. No Brasil, encontra-se incluída na lista de doenças que compõem o Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória. É considerada uma enfermidade em franca expansão territorial e de magnitude ascendente, cuja dinâmica de transmissão encontra-se associada a uma diversidade de parasitos e vetores, numa relação estreita em nichos ecológicos restritos.

L. (N.) whitmani, registrado na maioria dos Estados brasileiros, é um flebotomíneo incriminado como transmissor de duas leishmânias dermatópicas: *Le. (V.) shawi*, apenas na Amazônia, e *Le. (V.) braziliensis* em todas as regiões geográficas. A bibliografia mostra, ainda, estudos eco-epidemiológicos envolvendo este vetor, relatando comportamentos distintos, nas diferentes regiões do Brasil.

Diante desta evidência discute-se a questão de *L. (N.) whitmani* ser um complexo de espécies crípticas ou possuir heterogeneidade inter ou intrapopulacional associada à adaptação a diferentes ecótopos e a transmissão de diferentes espécies de *Leishmania*. Para um melhor entendimento da ecologia da LTA, deve-se levar em conta o conhecimento mais apurado sobre os flebotomíneos vetores, em especial pela definição da identidade taxonômica associada à competência vetorial.

O presente estudo avalia a variabilidade genética de populações *L. (N.) whitmani* procedentes de Buriticupu (MA), área com transmissão de *Le. (V.) shawi* e *Le. (V.) braziliensis*, Paragominas (PA), área com transmissão de *Le. (V.) shawi*, Meruoca (CE), área com transmissão de *Le. (V.) braziliensis* e de Ilhéus (BA), localidade tipo, área com transmissão de *Le. (V.) braziliensis*, com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre *L. (N.) whitmani* através da análise de polimorfismos no DNA (RAPD) genômico e da análise de DNA mitocondrial (Citocromo b), avaliando a variabilidade e o grau de estruturação genética, investigando a homogeneidade entre as populações e verificando se há algum grau de diferenciação entre elas.

3 – OBJETIVOS

Geral

Verificar a identidade taxonômica de *Lutzomyia (N.) whitmani*, importante transmissor de Leishmaniose Tegumentar Americana, no Brasil.

Específicos

- (1) Avaliar, através da análise de DNA, genômico e mitocondrial, a variabilidade e o grau de estruturação genética das populações de *L. (N.) whitmani* procedentes de Buriticupu (MA), Paragominas (PA), Meruoca (CE) e Ilhéus (BA).

- (2) Correlacionar os dados obtidos com a transmissão de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Le. (V.) shawi*.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – PROCEDÊNCIA DOS ESPÉCIMES DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

As populações foram selecionadas levando-se em conta a associação com espécies de *Leishmania (Viannia)* spp. Os espécimes foram coletados em: Buriticupu (Maranhão) - *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*, Paragominas (Pará) - *L. (V.) shawi*, Meruoca (Ceará) e Ilhéus (localidade-tipo) (Bahia) - *L. (V.) braziliensis* (Figs. 4.1 e 4.2).

Buriticupu (MA). O Município de Buriticupu situa-se nas coordenadas 45°30'S e 47°W, na Amazônia Maranhense a uma altitude média de 200 metros do nível do mar. O clima é quente-úmido, de transição entre o super-úmido amazônico e o semi-árido nordestino, com seis meses secos e precipitação média anual em torno de 1.800mm. O relevo da região é derivado da Formação Itapecuru que se estende praticamente por toda a metade norte do Estado. A cobertura vegetal original da Região está bastante devastada pela atividade madeireira e projetos agropecuários (IBGE 2009).

Paragominas (PA). Paragominas está situado nas coordenadas 47°21'10"W e 02°59'45"S, no sudeste paraense a uma altitude de 90 metros do nível do mar. O clima é mesotérmico e úmido, com temperatura média anual em torno de 25,5°C. A pluviometria fica entre 2.250 mm e 2.500 mm anuais. A vegetação original era de floresta densa, porém está bastante modificada pelos desmatamentos, causados pelo avanço da agropecuária; hoje grandes áreas da vegetação original são cobertas por mata secundária (IBGE 2009).

Meruoca (CE). O Município de Meruoca situa-se nas coordenadas 40°27'18"W e 03°32'31"S, no noroeste cearense, distando de 248 km da capital do Ceará, Fortaleza. O clima é tropical quente semi-árido com pluviometria média de 1.623,6 mm, com período chuvoso concentrado entre os meses de janeiro e abril. A vegetação é de floresta subcaducifolia espinhosa ou mata seca, e floresta subperenifolia tropical plúvio-nebular (IBGE 2009).

Ilhéus (BA). O Município de Ilhéus está localizado nas coordenadas 39°2'W e 14°47'S, litoral do Estado da Bahia. O clima é tropical quente e úmido, com precipitação média anual entre 1500 a 2000mm. No último ano, a temperatura média oscilou entre 19 e 28°C e a umidade relativa foi de 87,3%, em média. A vegetação original de Mata Atlântica está bastante modificada pela monocultura do cacau (IBGE 2009).

Na Tabela 4.1 estão descritas as distâncias, em quilômetros, entre as populações estudadas.

Tabela 4.1 – Distâncias entre as localidades estudadas. Valores expressos em quilômetros (Km). Dados obtidos pelo Google Earth[®].

	Buriticupu (MA)	Ilhéus (BA)	Meruoca (CE)	Paragominas (PA)
Buriticupu (MA)	-			
Ilhéus (BA)	1.414	-		
Meruoca (CE)	664	1.257	-	
Paragominas (PA)	182	1.593	768	-



Figura 4.1 – Representação esquemática do mapa do Brasil mostrando os locais de coletas das populações estudadas de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* Antunes & Coutinho, 1939. O quadro evidência a posição geográfica do Brasil na América do Sul.



Figura 4.2 - Imagem de satélite da costa brasileira evidenciando as localidades estudadas. Imagem obtida pelo Google Earth®.

4.2 – CAPTURAS E IDENTIFICAÇÃO DE *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

Os flebotomíneos foram capturados no peridomicílio e na mata, com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia & Chamberlain 1962), em todas as áreas trabalhadas, acondicionados tubos tipo *Eppendorf*[®] (tudo de polietileno de 1,5ml) e, imediatamente, criopreservados em nitrogênio líquido, para os estudos moleculares.

Ao realizar as coletas de flebotomíneos, outras espécies, que não *L. (N.) whitmani*, também foram capturadas. Portanto, a identificação precisa deste material é de fundamental importância para a realização do estudo. Os espécimes criopreservados foram retirados do nitrogênio e, individualmente, colocados em uma placa fria (criolizador) dentro de um recipiente de Isopor[®] com gelo seco; os três últimos segmentos abdominais foram dissecados e as genitálias colocadas em uma gota de hidróxido de potássio a 10%, entre lâmina e lamínula, e levadas ao microscópio para a identificação da espécie, através de análise das estruturas morfológicas. A identificação dos espécimes seguiu a chave taxonômica de Young & Duncan (1994).

Dos espécimes machos identificados como *L. (N.) whitmani* foi feita a extração do DNA (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Tabela indicando o número total de espécimes capturados, identificados, com extração de DNA e os utilizados nas análises.

	Total Capturado	Identificados como <i>L. (N.) whitmani</i>	DNA extraído	DNA utilizado
Buriticupu (MA)	104	62	20	10
Ilhéus (BA)	106	84	20	10
Meruoca (CE)	45	45	10	10
Paragominas (PA)	6	6	6	6
TOTAL	261	197	56	36

4.3 – EXTRAÇÃO DE DNA

Para as extrações de DNA foi utilizado o protocolo de Collins *et al.* (1987), com algumas modificações.

Os espécimes foram retirados do nitrogênio e separados individualmente em tubos tipo *Eppendorf*[®] estéril. Para cada tubo contendo um espécime foram adicionados 50µl do tampão de amostra (1,6 ml de NaCl 5M, 5,48g de Sucrose, 12 ml de EDTA 0,5M pH 8,0, 10 ml de tris-HCl 1M pH 9,0, 2,5 ml de SDS 20%) e 5µl de proteinase K – concentração final 100mg/ml foi realizada maceração com um pistilo cônico em polipropileno autoclavável estéril para tubos tipo *Eppendorf*[®] (Kontes). O pistilo foi enxaguado, dentro do tubo, com mais 50µl do tampão de amostra. Os tubos foram centrifugados 14.000 rpm por alguns segundos e, a seguir, colocados em banho-maria a 65°C por 15-30 minutos. Enquanto os tubos ainda estavam mornos, foi adicionado 1ml de K-Acetato 8M. Posteriormente, foram colocados no gelo por 30 minutos. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados na velocidade máxima a temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante foi imediatamente transferido para tubos tipo *Eppendorf*[®] novos e estéreis. Aos sobrenadantes foram adicionados 200µl de etanol absoluto (gelado) e, a seguir, misturados vertendo os tubos delicadamente; posteriormente os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm com refrigeração (4°C) por 15-20 minutos. Imediatamente, o etanol foi retirado com auxílio de uma pipeta, e foi iniciada a lavagem do sedimento, primeiro com 200µl de etanol 70% e posteriormente com 200µl de etanol absoluto. O sedimento foi colocado para secar a temperatura ambiente, até que nenhum traço de etanol permanecesse. O sedimento de DNA foi dissolvido com 50µl de H₂O MilliQ[®]. As amostras foram armazenadas a -20°C.

4.4 – ANÁLISE DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATOREAMENTE (RAPD-PCR)

4.4.1 – Padronização

Para a realização dos ensaios de RAPD-PCR, todas as amostras foram quantificadas com auxílio do GeneQuant (GE Healthcare); posteriormente foram diluídas para a concentração de 5ng/ml de DNA. A diluição foi feita com H₂O MilliQ[®].

Oligonucleotídeos decaméricos (*primers*) foram utilizados com seqüência arbitrária [Ready-To-Go[™] RAPD Analysis Kit] (GE Healthcare) para amplificar o DNA genômico dos isolados. Cada reação do kit contém Amplitaq[™] DNA polimerase, 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 mg de BSA, 3 mM de MgCl₂, 30 mM KCl e 10 mM de Tris (pH 8,3). As reações de RAPD foram feitas segundo as recomendações do fabricante.

4.4.2 – Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os quatro diferentes *primers* utilizados para amplificar os DNAs de *Lutzomyia (N.) whitmani*, provenientes das quatro localidades estudadas, estão descritos na tabela 4.3.

Tabela 4.3. *Primers* para a análise de RAPD

Primers	Seqüências
P1	5'-GGTGCGGGAA-3'
P3	5'-GTAGACCCGT-3'
P4	5'-AAGAGCCCGT-3'
P6	5'-CCCGTCAGCA-3'

4.4.3 – Análise por RAPD-PCR

4.4.3.1 – RAPD-PCR

Para realizar os ensaios de RAPD-PCR foi utilizado o kit [Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit] (GE Healthcare), onde cada reação continha Amplitaq™ DNA polimerase, 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 mg de BSA, 3 mM de MgCl₂, 30 mM KCl e 10 mM de Tris (pH 8,3) para um volume final de 25µl. As reações foram realizadas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A amplificação foi feita no termociclador PxE 0.2 Thermal Cycler, da Thermo Electron Corporation, com o seguinte perfil térmico: 1º ciclo de 95°C, 5 min e 40 ciclos de 95°C, 1 min; 36°C, 1 min; 72°C, 2 min. Todos os ensaios foram realizados com três repetições, para garantir a reprodutibilidade dos fragmentos amplificados.

4.4.3.2 – Visualização dos produtos amplificados.

Uma visualização prévia para identificar as amostras amplificadas, foi feita em gel de agarose a 2% com tampão TBE 0,5X, cujos produtos foram corados com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante, visualizados em um transiluminador (Bio-Rad) sob a luz Ultravioleta e documentados em fotografias digitais pelo sistema de documentação de gel (GelDoc, Bio-Rad). Posteriormente, as amostras amplificadas foram visualizadas em gel de poli(acrilamida) a 7%, revelado com prata (Bio-Rad Silver Stain) e documentados em fotografias digitais, pelo sistema de documentação de gel (GelDoc, Bio-Rad).

4.4.3.3 – Análises dos dados de RAPD

Foram utilizada doze amostras em cada gel sendo 3 representantes de cada população. A partir da presença (representada pelo número 1) ou ausência (representada pelo número 0) de cada fragmento específico de DNA amplificado, foi feita uma matriz de dados binários, considerando as bandas de mesmo tamanho homólogas (ANEXO 2). A partir dessa matriz um dendograma foi construído usando o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), disponíveis no programa DendroUPGMA (S. Garcia-Vallvé, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Rovira i Virgili, Tarragona, Espanha [<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>]).

4.5 – ANÁLISE DE DNA MITOCÔNDRIAL (Citocromo *b*)

Um fragmento de aproximadamente 500pb foi obtido a partir da reação de PCR com os *primers*: *forward* CB3-PDR (5'-3' CA(T/C)ATTCAACC(AT)GAATGATA) e *reverse* N1N-PDR (5'-3' GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTTCG(T/A)TATGA). Deste fragmento foram utilizados apenas 316pb correspondentes a porção final do gene do citocromo *b*, o restante do fragmento amplificado, além do gene, foi desconsiderado. O protocolo seguido foi o mesmo utilizado por Ishikawa *et al.* (1999). As reações de PCR foram feitas utilizando o termociclador PxE 0.2 Thermal Cycler, da Thermo Electron Corporation, com o seguinte perfil térmico: etapa de desnaturação inicial com 94°C por 7 minutos; 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos; período de extensão final de 7 minutos a 72°C.

4.5.1 – Visualização dos produtos amplificados

A visualização dos produtos amplificados de DNA mitocondrial foi feita em gel de agarose a 1%, corados com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), visualizados sob luz Ultravioleta e documentados em fotografias digitais pelo sistema de documentação de gel (GelDoc, Bio-Rad).

4.5.2 – Purificação das amostras

As amostras amplificadas foram purificadas utilizando o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), e visualizadas em gel de agarose a 1% corados com GelRed, visualizados sob luz ultravioleta e documentados em fotografias digitais pelo sistema de documentação de gel (GelDoc, Bio-Rad), para verificação do resultado da purificação. As amostras purificadas foram separadas para o seqüenciamento.

4.5.3 – Seqüenciamento do Citocromo b

As amostras selecionadas foram submetidas à reação de seqüenciamento com utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10µL, constituído por 2,3µL de água destilada, 3,2µL do *primer* a 1pmol/µL (C3B-PDR e N1N-PDR), 1µL do mix Big Dye Terminator, 1,5µL do tampão e 2µL do produto de PCR purificado. As condições da reação foram: 40 ciclos de 94°C por 10seg, 50°C por 5seg e 60°C por 4 min. Para cada amostra foram feitas duas reações de seqüenciamento com cada um dos *primers*.

Posteriormente, as reações foram analisadas em sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) do Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

4.5.4 – Análise das seqüências

Com o MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) foram realizadas as análises de distância entre as seqüências, definição dos haplótipos e a construção de árvores pelo método de Neigbor-Joining (NJ) utilizando a distância p . O suporte estatístico dos ramos foi obtido através dos valores de *bootstrap* com 1.000 replicações ao acaso.

O cálculos de diversidade nucleotídica (Pi), teste de neutralidade de polimorfismo (D Tajima) e diferenciação entre as populações (Fst) foram calculado com DnaSP versão 5 (Librado & Rozas 2009).

Para as análises filogenéticas inicialmente foram utilizadas 9 seqüências parciais do gene Citocromo *b* disponíveis no Genbank: *Lutzomyia whitmani* (código de acesso U80966), *Lutzomyia henandezii* (código de acesso AY316736), *Lutzomyia panamensis* (código de acesso EF012217), *Brumptomyia beaupertuyi* (código de acesso AF448546), *Brumptomyia devenanzii* (código de acesso AF448545), *Phlebotomus tobbi* (código de acesso CQ169350), *Phlebotomus perfiliewi* (código de acesso GQ169341), *Phlebotomus major* (código de acesso GQ169336); 2 seqüências de *Brumptomyia brumpti* e as 29 seqüências de *L. (N.) whitmani* obtidas neste estudo. As seqüências correspondem à porção final do gene entre as posições 822 e 1.138.

As diferentes seqüências encontradas no Genbank foram utilizadas para a escolha de grupos externos. Após uma avaliação preliminar as seqüências de *L. henandezii* e *L. panamensis* foram selecionadas por serem geneticamente mais próximas e utilizadas na análise final.

5 – RESULTADOS

5.1 – ANÁLISES DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATOREAMENTE (RAPD/PCR)

A utilização de quatro *primers* possibilitou evidenciar bandas claramente definidas e reprodutivas, sendo selecionadas para a análise aquelas que estiveram amplificadas em todos os ensaios de PCR. Foram utilizados DNA de 36 exemplares de *L. (N.) whitmani*.

Após a resolução em gel de poliacrilamida, ainda que os géis tenham sido corridos simultaneamente, para assegurar o mesmo tempo de corrida e possibilitar a construção de uma matriz a partir de bandas homólogas, esta construção com todos os indivíduos se mostrou inviável, já que em muitos casos havia incerteza quanto a homologia de bandas de gels diferentes. Então, optou-se por refazer a análise utilizando-se apenas os quatro melhores géis, com 3 indivíduos de cada população (Figs. 5.1, 5.2, 5.3, 5.4). O maior número de fragmentos observados foi encontrado entre 200 e 1.500 pares de base (pb). Bandas ambíguas e indistinguíveis foram desconsideradas.

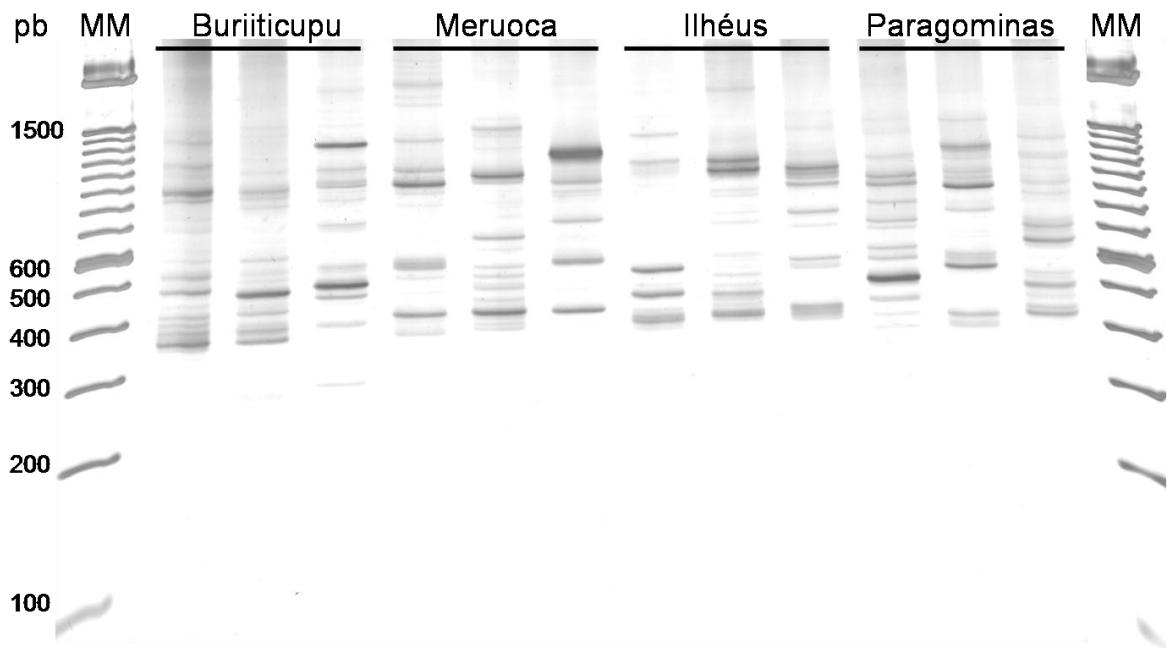


Figura 5.1 – Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs de *L. (N.) whitmani* das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo *primer 1*, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).

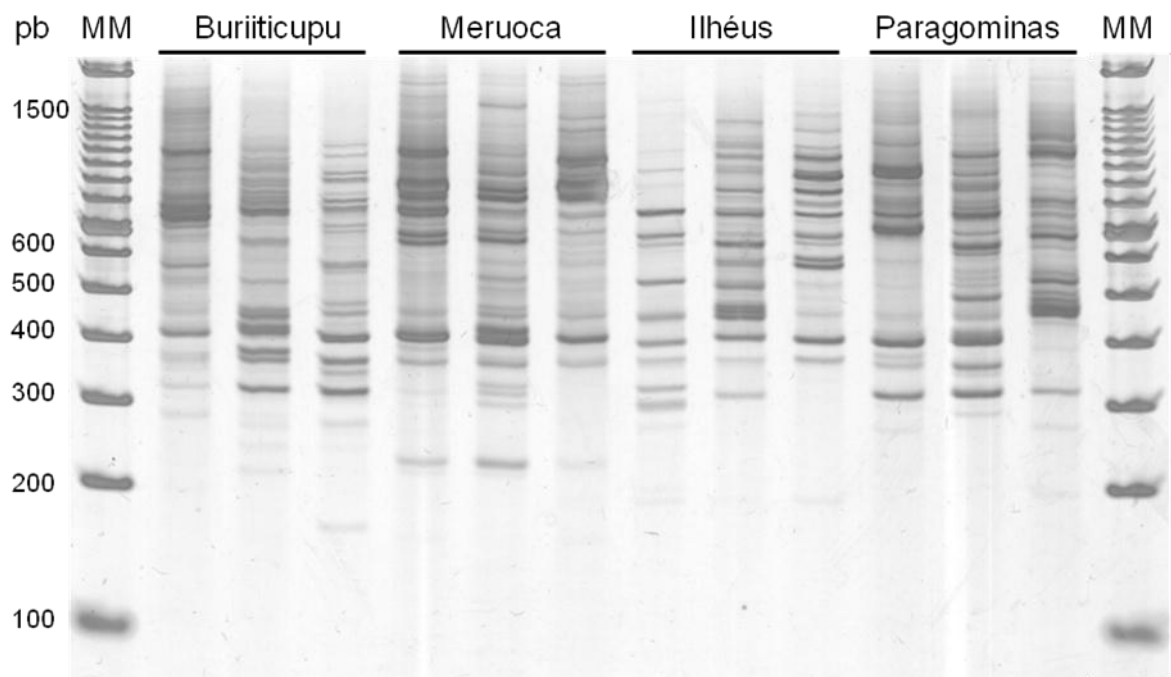


Figura 5.2 – Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs *L. (N.) whitmani* das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo *primer 3*, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).

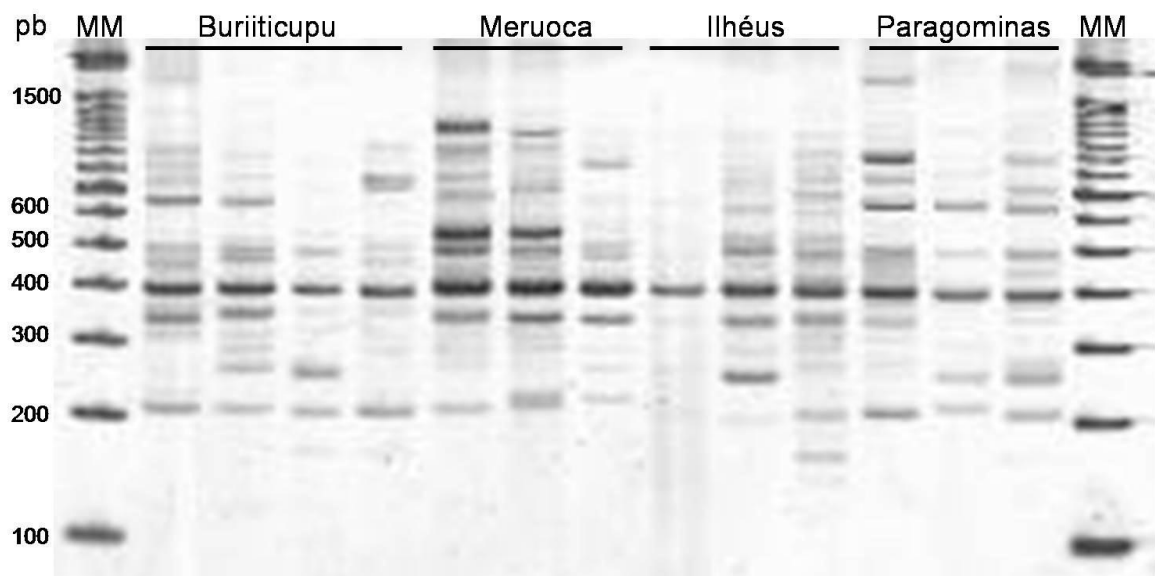


Figura 5.3 – Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs *L. (N.) whitmani* das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo *primer 4*, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população e ainda um fragmento comum a todas. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).

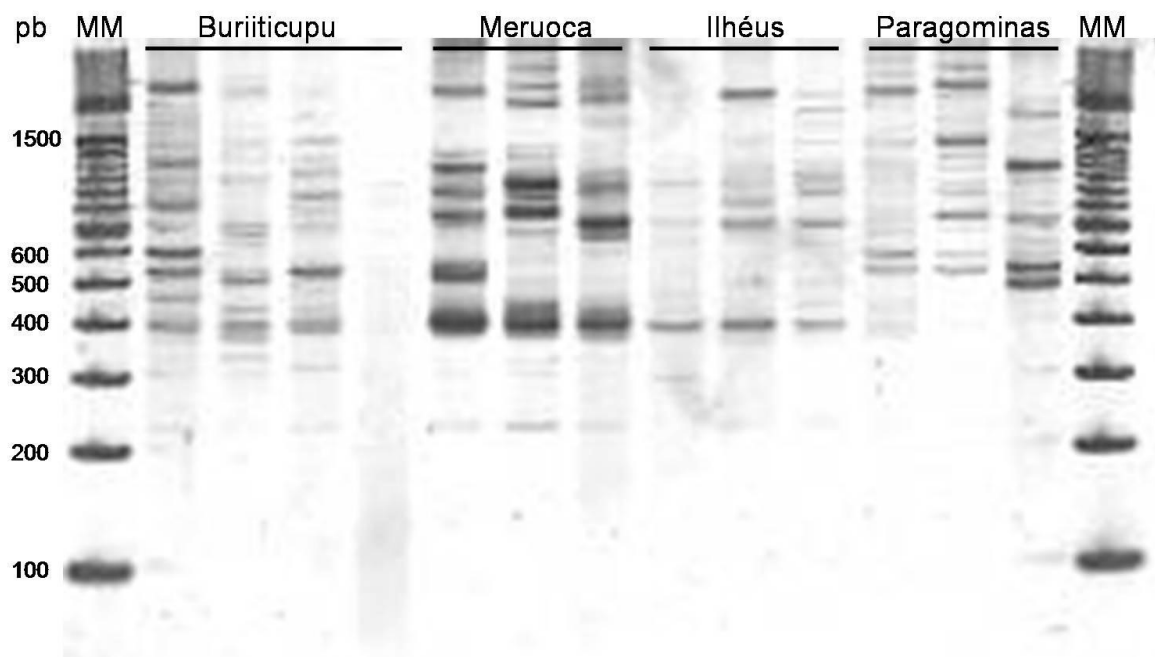


Figura 5.4 – Gel de poliacrilamida em TBE a 7%. Perfis eletroforéticos de DNAs *L. (N.) whitmani* das quatro populações estudadas amplificados por RAPD-PCR pelo *primer 6*, onde é possível observar os diferentes padrões de perfis para cada população. Cada coluna contém produtos amplificados de flebotomíneos individuais. MM = Marcador de peso molecular (100 pb).

A partir da análise de 84 *loci*, (bandas independentes) gerados pela amplificação dos quatro *primers* utilizados no estudo foi construída uma matriz de similaridade (Tabela 5.1) baseadas no coeficiente de Jaccard, assim como um dendograma (Fig. 5.5). O dendograma mostra que é possível correlacionar o agrupamento gerado com a localização geográfica de cada população. As populações de Buriticupu e Paragominas ficaram agrupadas num único ramo e as de Ilhéus e Meruoca em ramos separados.

Tabela 5.1 – Matriz de similaridade baseada no coeficiente de Jaccard com base nos dados obtidos pelos *primers* 1, 3, 4 e 6. Matriz apresenta os valores de similaridade individuais para cada espécime de cada população. (1B, 2B, 3B = Buriticupu; 1M, 2M, 3M = Meruoca; 1I, 2I, 3I = Ilhéus; 1P, 2P, 3P = Paragominas). Valores próximos a 1 maior similaridade.

	1B	2B	3B	1M	2M	3M	1I	2I	3I	1P	2P	3P
1B	1	0,489	0,347	0,271	0,316	0,356	0,256	0,314	0,286	0,422	0,275	0,340
2B		1	0,347	0,271	0,316	0,386	0,256	0,396	0,286	0,333	0,300	0,288
3B			1	0,295	0,291	0,267	0,250	0,312	0,311	0,277	0,298	0,370
1M				1	0,435	0,444	0,250	0,318	0,350	0,341	0,400	0,234
2M					1	0,404	0,341	0,385	0,388	0,327	0,346	0,241
3M						1	0,250	0,289	0,385	0,250	0,273	0,184
1I							1	0,457	0,382	0,20	0,256	0,159
2I								1	0,463	0,356	0,378	0,362
3I									1	0,39	0,381	0,224
1P										1	0,475	0,326
2P											1	0,319
3P												1

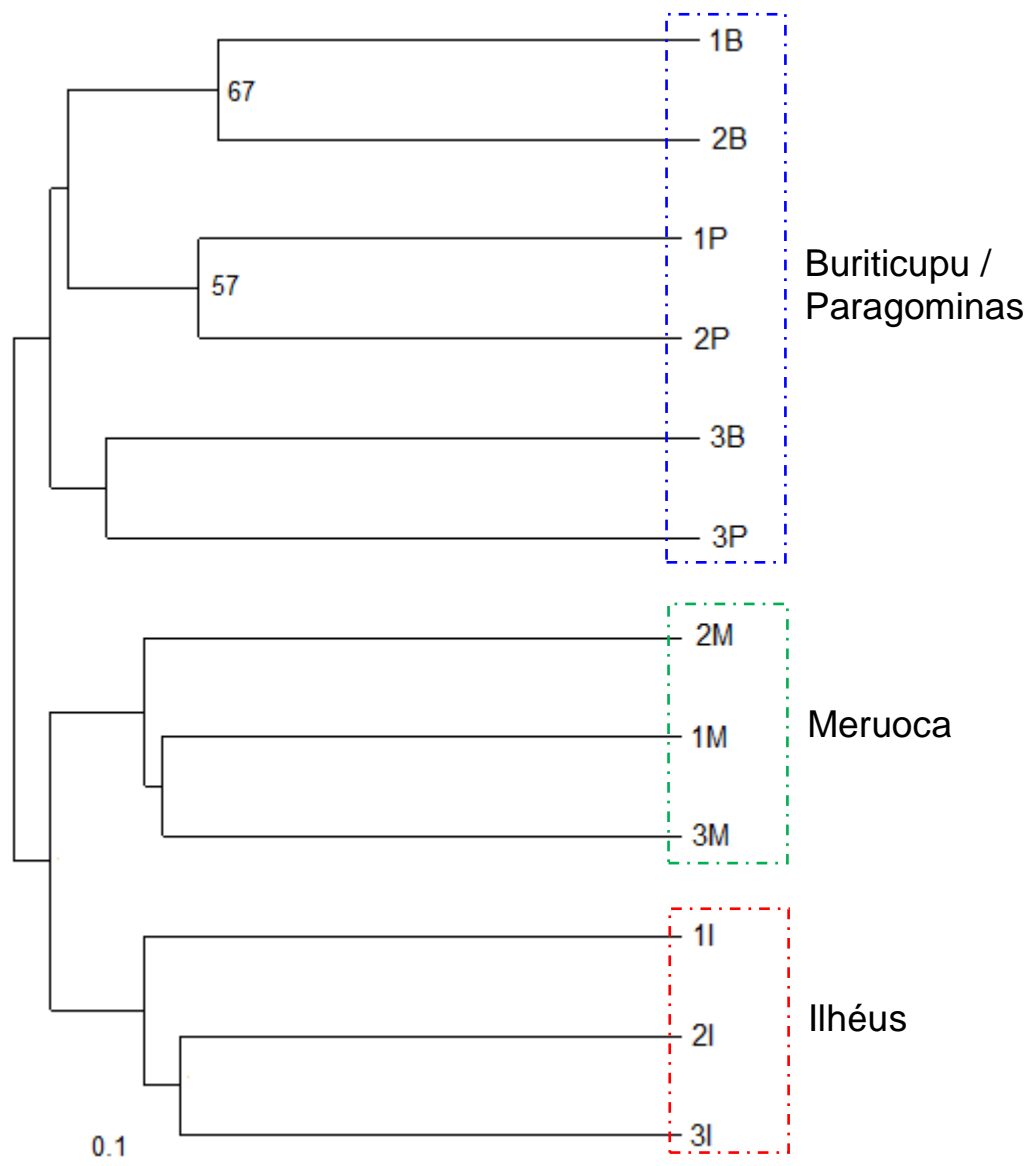


Figura 5.5 – Dendrograma das distâncias genéticas individuais das populações de *L. (N.) whitmani*, Buriticupu (MA), Meruoca (CE), Paragominas (PA) e Ilhéus (BA), gerado a partir da análise dos *primers* 1, 3, 4 e 6, mostrando um agrupamento correlacionado com a localização de cada população. Os números representam os valores de *bootstraps* baseados em 1000 réplicas. São mostrados apenas os valores de *bootstrap* acima de 50%.

5.2 – ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL (Citocromo *b*)

5.2.1 – Análise e definição dos haplótipos

Das 36 amostras de *L. (N.) whitmani* amplificadas e purificadas e que foram submetidas à reação de seqüenciamento, sete foram descartadas devido à má qualidade (Tabela 5.2).

Com base nos valores de distância *p* calculados entre as seqüências de *L. (N.) whitmani* foram identificados os diferentes haplótipos (Tabela 5.3 e Figura 5.6). Dentre as seqüências, três foram coincidentes constituindo um haplótipo denominado Haplótipo 1 (HAP-1), que inclui dois espécimes provenientes de Ilhéus (BA) e a seqüência de *L. (N.) whitmani* obtida no GenBank. Cinco seqüências provenientes de Buriticupu (MA) junto com duas de Paragominas (PA) foram coincidentes, formando um haplótipo denominado Haplótipo 7 (HAP-7). Outras quatro seqüências provenientes de Meruoca (CE) coincidiram e constituíram um haplótipo denominado Haplótipo 13 (HAP-13). As demais seqüências caracterizaram outros 16 haplótipos numerados de 2 a 19, desconsiderando os 7 e 13 citados anteriormente (Tabela 5.3).

A maior distância genética (distância *p*) estimada para *L. (N.) whitmani* foi entre os haplótipos HAP-4 e HAP-16 (0,049), HAP-5 e HAP-16 (0,049), e a menor foi de 0,004 entre os haplótipos HAP-1 e HAP-2, HAP-1 e HAP-3, HAP-6 e HAP-10, HAP-7 e HAP-10, HAP-7 e HAP-11, HAP-7 e HAP-17, HAP-7 e HAP-18, HAP-7 e HAP-19, HAP-12 e HAP-13, HAP-13 e HAP-14 (Anexo 1). À distância *p* entre os haplótipos de *L. (N.) whitmani* e as demais espécies variaram da seguinte forma: para *L. hernandezii* de 0,039 a 0,056, para *L. panamensis* de 0,147 e 0,165 (Anexo 1).

Na tabela 5.4 constam os 26 sítios variáveis entre os 19 haplótipos de *L. (N.) whitmani* e na tabela 5.5 constam as substituições de aminoácidos encontradas entre estas seqüências.

Tabela 5.2 – Amostras sequenciadas nas análises de DNA mitocondrial separadas por localidade. (*) Amostras descartadas.

Nº	Código	Localidade
1	M1B	Buriticupu (MA)
2	M2B	
3	M3B	
4	M4B	
5	M5B	
6	M6B	
7	M7B	
8	M8B	
9	M9B	
10	M10B	
11	M1M	Meruoca (CE)
12	M2M	
13	M3M	
14	M4M	
15	M5M	
16	M6M	
17	M7M	
18	M8M*	
19	M9M	
20	M10M*	
21	M11*	Ilhéus (BA)
22	M2I	
23	M3I	
24	M4I*	
25	M5I	
26	M6I*	
27	M7I	
28	M8I*	
29	M9I	
30	M10I	
31	M1P	Paragominas (PA)
32	M2P	
33	M3P*	
34	M4P	
35	M5P	
36	M6P	

Tabela 5.3 – Lista dos haplótipos de *Lutzomyia (N.) whitmani* identificados neste estudo, especificando a amostra e o Município de captura.

Haplótipo	Amostra	Município de captura
HAP-1	M2I, M10I, “U80966”	
HAP-2	M3I	
HAP-3	M5I	Ilhéus (BA)
HAP-4	M7I	
HAP-5	M9I	
HAP-6	M1B	Buriticupu (MA)
HAP-7	M2B, M3B, M4B, M8B, M10B, M1P, M2P	Buriticupu (MA) / Paragominas (PA)
HAP-8	M5B	
HAP-9	M6B	
HAP-10	M7B	Buriticupu (MA)
HAP-11	M9B	
HAP-12	M1M	
HAP-13	M2M, M3M, M5M, M6M	
HAP-14	M4M	Meruoca (CE)
HAP-15	M7M	
HAP-16	M9M	
HAP-17	M4P	
HAP-18	M5P	Paragominas (PA)
HAP-19	M6P	

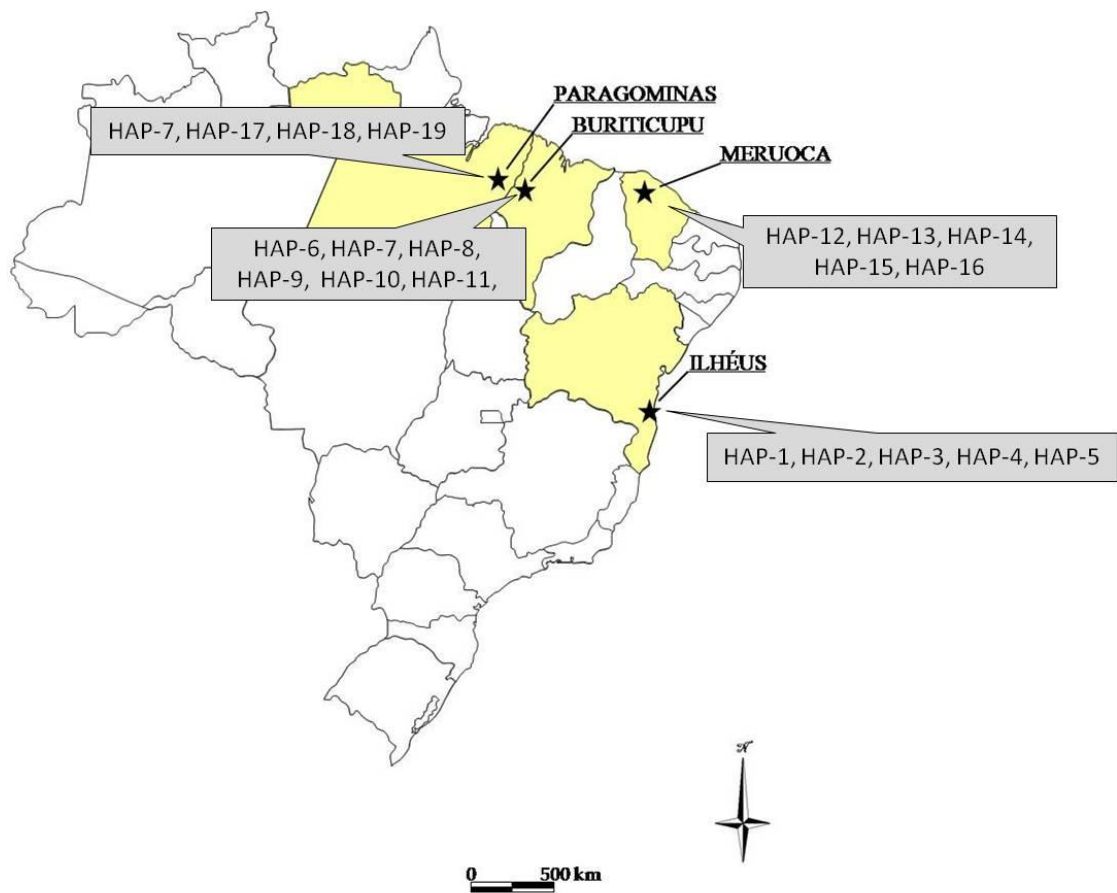


Figura 5.6 – Mapa indicativo da localização geográfica dos haplótipos de *Lutzomyia (N.) whitmani* obtidos nesse estudo. Nomes dos haplótipos estão indicados dentro dos balões próximos a indicação da localidade.

Tabela 5.5 – Mutações observadas na sequência de aminoácidos do citocromo b nos diferentes haplótipos.

Haplótipos	Sítios variáveis						
	2	2	3	3	3	3	3
	9	9	0	2	4	7	7
	6	7	8	1	6	5	8
HAP-1	V	I	L	I	D	S	A
HAP-2	N	.	.
HAP-3
HAP-4
HAP-5	N	.	.
HAP-6
HAP-7
HAP-8	.	.	F
HAP-9	T
HAP-10
HAP-11
HAP-12	I	M	.	.	.	N	S
HAP-13	.	M	.	.	.	N	S
HAP-14	.	M	.	.	.	N	S
HAP-15	.	M	.	.	.	N	S
HAP-16	.	M	.	.	.	N	S
HAP-17	.	.	.	V	.	.	.
HAP-18
HAP-19

5.2.2. – Diferenciação entre as populações.

A tabela 5.6 apresenta um sumário dos polimorfismos encontrados em cada localidade. A população com o maior valor de Pi foi Ilhéus enquanto a menos polimorfica foi Paragominas. Nenhum dos valores do teste de Tajima foi estatisticamente significativo.

Tabela 5.6 – Polimorfismos no gene mitocondrial do Citocromo b em associação a localização geográfica das populações de *Lutzomyia (N.) whitmani*.

	n	h	S	nº transversões	Pi	Tajima's D
Buriticupu	10	6	9	2	0,00741	-1,4731
Meruoca	8	5	6	1	0,00514	-1,0900
Ilhéus	6	5	7	1	0,00902	-0,2513
Paragominas	5	4	3	1	0,00421	-1,0485

* n , Número de sequências; h , número de haplótipos; S, número de sítios polimórficos, Pi , D Tajima. Todos os valores de D Tajima são estatisticamente não significantes.

Tabela 5.7 apresenta os valores de Fst das comparações par-a-par entre as quatro populações. Todos os valores foram significativos com exceção da comparação entre as populações de Buriticupu e Paragominas.

Tabela 5.7 - Valores de diferenciação entre as populações de *Lutzomyia (N.) whitmani* estimados por Fst.

	Fst		
	Buriticupu	Meruoca	Ilhéus
Meruoca	0,79091		
Ilhéus	0,73609	0,81040	
Paragominas	0,02614	0,85361	0,79114

5.2.3. – Genealogia das sequências

A Figura 5.7 mostra uma árvore de distância de todas as sequências obtidas de *L. (N.) whitmani* (não apenas os diferentes haplótipos), construída pelo método de *Neighbor-joining*. Nesta árvore as sequências de *L. hemandezii* e *L. panamensis* são utilizadas como grupo externo.

Na árvore podem ser observados três agrupamentos principais de seqüências e seus respectivos haplotipos:

- (I) Seqüências dos Municípios de Buriticupu (MA) (1B, 2B, 3B, 4B, 6B, 7B, 8B, 9B e 10B) e Paragominas (PA) (1P, 2P, 4P, 5P e 6P) correspondendo aos haplotipos HAP-6, HAP-7, HAP-9, HAP-10, HAP-11, HAP-17, HAP-18 e HAP-19.
- (II) Seqüências *L. whitmani* North East, 2I, 3I, 5I, 7I, 9I, 10I do Município de Ilhéus (BA) correspondendo aos haplotipos HAP-1, HAP-2, HAP-3, HAP-4 e HAP-5.
- (III) Sequencias 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M e 9M de Meruoca (CE) correspondendo aos haplótipos HAP-12, HAP-13, HAP-14, HAP-15, HAP-16.

A divisão das seqüências nestes três agrupamente é consistente com os valores de F_{st} apresentados na tabela 5.7 que coloca as populações dos Municípios de Buriticupu (MA) e Paragominas (PA) como geneticamente mais próximas. Além destes três grupos, pode-se ainda observar um quarto ramo formado apenas pela sequencia 5B do Município de Buriticupu.

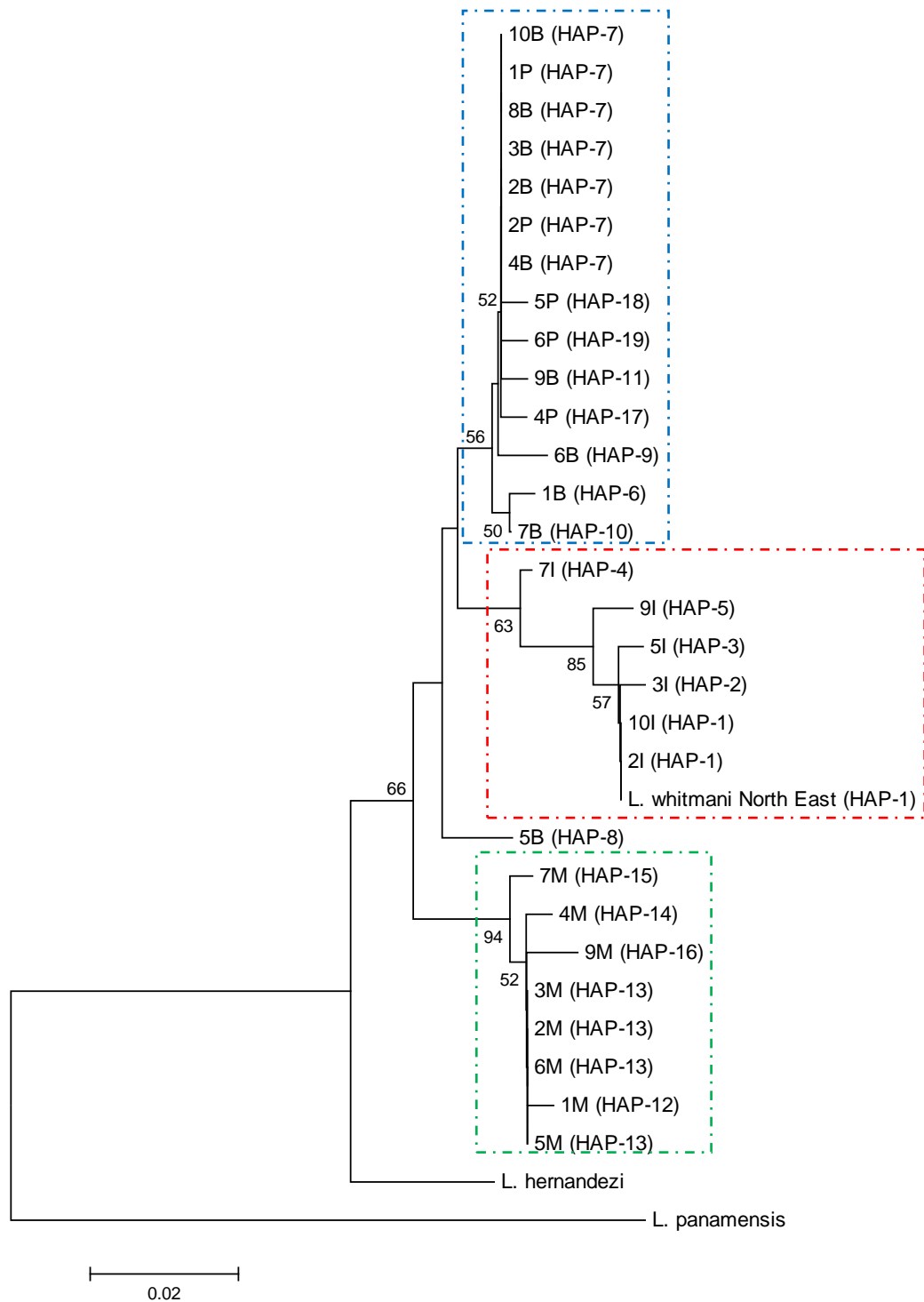


Figura 5.7 – Árvore de distância entre as amostras de *Lutzomyia (N.) whitmani* construída pelo método de *Neighbor-joining* utilizando os 316 pb finais do gene Citocromo *b*. As seqüências de *L. henandezii* e *L. panamensis* são utilizadas como grupo externo. Os números dos nós são os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 replicações. São mostrados apenas os valores de *bootstrap* acima de 50%. Os retângulos pontilhados marcam os três principais agrupamentos encontrados.

6 – DISCUSSÃO

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani ocorre no Brasil em associação com diferentes tipos de vegetação, o que evidencia sua presença nos variados biomas, que compreendem a Floresta Amazônica, Cerrado, Savana, Caatinga e Mata Atlântica. Claramente está adaptado a diferentes condições climáticas, áreas preservadas e impactadas, onde apresenta comportamento diferenciado e ocupa distintos habitats, que vão desde o ambiente silvestre até o interior das residências (Young & Duncan, 1994, Costa *et al.* 2005, Rangel & Lainson, 2009).

A adaptação de *L. (N.) whitmani* a novas paisagens, ambientes impactados e a sua ampla distribuição geográfica o coloca na posição do mais importante transmissor de LTA no Brasil, e como exemplo de flebotomíneo capaz de se adaptar aos ambientes modificados por alterações antrópicas ou, possivelmente, por mudanças climáticas globais (Peterson & Shaw 2003, Shaw 2008, Rangel & Lainson 2009).

Crítérios morfológicos/morfométricos têm sustentado a descrição de várias espécies, sendo consideradas ferramentas importantes. Segundo Amorin (1977), da mesma forma que dados moleculares, os dados morfológicos podem representar com fidelidade uma história evolutiva, que possa elucidar questões taxonômicas. Nesta lógica, *L. (N.) whitmani* está representada por linhagens geográficas bem caracterizadas: Norte, Nordeste e Sudeste (Rangel *et al.* 1996, Margonari *et al.* 2004), hipótese corroborada por estudos com marcadores moleculares (Rangel *et al.* 1996, Ready *et al.* 1998, Margonari *et al.* 2004).

A opção de trabalhar no presente estudo com populações de *L. (N.) whitmani* de diferentes biomas e perfis epidemiológicos de LTA foi à tentativa de comparar possíveis distintas populações, na busca de alguma evidência que pudesse ser discutida no âmbito da posição taxonômica da espécie. Independente da área de escolha pode-se constatar que a espécie encontra-se bem adaptada ao ambiente domiciliar e impactado por ações antrópicas, nesse último aspecto em especial as populações procedentes de Paragominas (PA) e Buriticupu (MA). Estas duas

regiões pertencentes à Amazônia Maranhense, originalmente caracterizada por vegetação do tipo Floresta Amazônica, hoje estão com a cobertura vegetal bastante comprometida, principalmente pela atividade de exploração madeireira; contudo, em Paragominas ainda pode-se observar uma área coberta por mata secundária.

Há que se destacar, ainda, que incluir neste estudo a população de Buriticupu (MA) deveu-se ao fato de que a região tem registros de transmissão autóctone de duas leishmânias, sabidamente veiculadas por *L. (N.) whitmani* em outras áreas endêmicas do Brasil, aliado ao fato de que na região este flebotomíneo mescla hábitos e habitats (ambiente domiciliar e mata) e alterna atividade (crepuscular e noturna) (Rebêlo *et al.* 2000). Tais evidências fazem supor que a transmissão das duas leishmânias estaria se dando através de *L. (N.) whitmani* e que, em se tratando de populações diferentes, estas estariam ocorrendo em simpatria. Obviamente analisar espécimes desta área, é importante para os objetivos do presente estudo.

Independente da área de escolha pode-se constatar que a espécie encontra-se bem adaptada ao ambiente domiciliar e impactado por ações antrópicas, nesse último aspecto em especial as populações procedentes de Paragominas (PA) e Buriticupu (MA). Estas duas regiões pertencentes à Amazônia Maranhense, originalmente caracterizada por vegetação do tipo Floresta Amazônica, hoje estão com a cobertura vegetal bastante comprometida, principalmente pela atividade de exploração madeireira; ainda que, em Paragominas pode-se observar uma restrita área coberta por mata secundária.

Na questão que associa *L. (N.) whitmani* com a transmissão de duas diferentes espécies de leishmânia, sob a ótica da especificidade entre parasito e vetor, em parte determinada pelos hábitos e habitats do vetor, seria razoável admitir que este flebotomíneo na verdade seria um complexo de espécies, com base em todas as evidências de comportamento e de competência vetorial. Contudo, não se pode desconsiderar a discussão que trata de flebotomíneos vetores “permissíveis”. Sabidamente a adesão de promastigotas ao epitélio do tubo digestivo do flebotomíneo vetor é mediada pela molécula lipofosfoglicana (LPG) (Pimenta *et al.* 1994, 2003). Porém, alguns estudos sugerem que outros processos podem estar envolvidos na interação promastigotas-flebotomíneo vetor, o que poderia explicar a infecção de uma mesma espécie de flebotomíneo por uma ou mais espécies de

leishmânias (Volf *et al.* 2007, Volf & Myskova 2007). Entretanto, o fato da infecção por leishmânia por si só não sustenta a hipótese da transmissão, pois é notório que os flebotomíneos são oportunistas e ecléticos na busca do repasto sanguíneo e eventualmente podem se alimentar em reservatórios de leishmânias que não representam a associação natural mais comum, o que não assegura nomear o flebotomíneo como vetor do parasita. Um flebotomíneo que habita preferencialmente as copas das árvores terá contato com um reservatório que habite o mesmo sítio, seguindo raciocínio idêntico para flebotomíneos que tem suas atividades mais relacionadas ao nível do solo.

Critérios morfológicos/morfométricos, considerados a base da taxonomia, têm sustentado a descrição de várias espécies, sendo consideradas ferramentas importantes. Segundo Amorin (1977), os dados morfológicos podem representar com fidelidade uma história evolutiva, que possa elucidar questões taxonômicas. Nesta lógica, *L. (N.) whitmani* está representada por linhagens geográficas bem caracterizadas: Norte, Nordeste e Sudeste (Rangel *et al.* 1996, Margonari *et al.* 2004), hipótese corroborada por estudos com marcadores moleculares (Rangel *et al.* 1996, Ready *et al.* 1998, Margonari *et al.* 2004).

Na comparação com as populações de Ilhéus (BA) e Meruoca (CE), nossos resultados apontaram para uma maior proximidade genética dos indivíduos de Buriticupu (MA) e de Paragominas (PA), revelada pela árvore na fig. 5.7 e pelo valor de F_{st} bastante baixo entre essas duas populações (~2%), principalmente quando comparado aos outros valores observados que foram sempre maiores que 70%. Isto não surpreende, considerando que os municípios pertencem ao mesmo bioma, que distam, entre si, menos de 200 km e que os indivíduos destas populações de *L. (N.) whitmani* são tipicamente silvestres e estão associados à transmissão de *Le. (V.) shawi*.

Há que se considerar a hipótese de que a heterogeneidade interpopulacional que separa o agrupamento Paragominas/Buriticupu das demais populações teria uma relação com a transmissão de *Le. (V.) shawi*, restrita à população *L. (N.) whitmani* da Amazônia, se considerados alguns aspectos particulares desta linhagem, dentre eles o fato de que os espécimes podem ser coletados com grande

frequência na copa das árvores, onde habita o reservatório desta leishmânia, a preguiça *Choloepus didactylus* (Lainson & Shaw 2005, Rangel & Lainson 2009)

Uma futura análise de um número maior de indivíduos de Buriticupu talvez revele sequências que não se agrupem com Paragominas, e sim com Ilhéus. Se isto acontecer, seria interessante verificar se estas seriam oriundas de indivíduos que teriam um comportamento de adaptação ao ambiente domiciliar e estariam envolvidos na transmissão de *Le. (V.) brasiliensis*. Contudo, considerando a ocorrência de introgressão entre *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* (Marcondes *et al.* 1997, Mazzoni *et al.* 2006, 2008), é muito provável que o mesmo ocorra entre as possíveis espécies crípticas de *Lu. whitmani*. Neste caso, talvez não seja observada uma diferenciação clara entre populações simpátricas em um marcador mitocondrial.

O agrupamento constituído pelos indivíduos de Meruoca pode refletir uma adaptação a condições fisiogeográficas diferentes das de Ilhéus, cuja vegetação é típica de Mata Atlântica, muito embora as duas populações sejam consideradas como responsáveis pela transmissão de *Le. (V.) brasiliensis* e apresentam comportamento característico de espécie adaptada ao ambiente domiciliar, ocupando sítios no peridomicílio. Meruoca é um dos municípios serranos e tipicamente representa uma área do semi-árido nordestino, numa zona fisiogeográfica do Sertão Centro-norte do Estado do Ceará, cuja vegetação é do tipo floresta subcaducifolia espinhosa ou mata seca. Esta população apresenta os maiores valores de divergência genética quando comparada com as demais populações com valores de F_{st} de ~85% para Paragominas, ~81% para Ilhéus e ~79% para Buriticupu.

7 – CONCLUSÃO

Em conclusão, no presente estudo, as análises de sequências do DNA mitocondrial, como também os resultados obtidos com os marcadores de RAPD-PCR, sugerem a existência de três agrupamentos ou clados que poderiam representar linhagens genéticas distintas: um para a localidade-tipo, Ilhéus (BA), um para Meruoca (CE) e um terceiro relativo à região Buriticupu (MA) / Paragominas (PA). Tais linhagens, em parte, estão coincidentes com as sugeridas em outros estudos, como populações geográficas e associadas a fatores bioclimáticos (Rangel *et al.* 1996, Ready *et al.* 1997, Margonari *et al.*, 2004). Estes resultados, portanto, representam uma evidência adicional a favor da hipótese de *L. (N.) whitmani* ser um complexo de espécies crípticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso MMS. 2008. Estudos sobre algumas populações brasileiras de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): morfologia, morfometria e hábitos alimentares. (Dissertação de Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais; 2008
- Amorim DS 1997. *Elementos básicos de sistemática filogenética*. 2 ed. Holos editora & Soc. Bras. Entomologia. 276pp.
- Antunes PCA, Coutinho JO 1939. Notas sobre flebotomos Sul-Americanos. II Descrição de *Flebotomus whitmani* n. sp. e da armadura bucal de algumas espécies. *Bol. Biol. São Paulo, N. S. n. 4*, p.448-453.
- Azevedo ACR, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lopes VG 1990. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturite, Ceará state, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 251.
- Azevedo ACR, Rangel EF 1991. A study of sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 405-410.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MC, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, Rangel EF 2008. Studies on the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American cutaneous leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 760-767.
- Barretto MP 1943. *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae)*, Tese de Livre-Docência, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 162 pp.

- Barreto AC, Vexenat JA, Cuba-Cuba CA, Marsden PD 1982. Fauna flebotomínica de uma região endêmica de leishmaniose cutâneo-mucosa no Estado da Bahia. IX Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas, 147 pp.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter I, Shaw JJ 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 291-296.
- Brandão-Filho SP, de Carvalho FG, de Brito ME, Almeida Fde A, Nascimento LA 1994. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Jul-Sep;89(3)*: 445-449.
- Brasil. 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância de Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1 ed. – Brasília: Editora Ministério da Saúde, p.120.
- Brasil. 2007. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 182 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Brazil RP, Morton IE, Ward RD. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera Psychodidae) in Ceará State northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 (4): 497-498.
- Brazil RP, Brazil, BG 2003. Biologia de Flebotomíneos Neotrópicos. p:257-274. In *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Rangel & Lainson, Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Cabrera MAA, Paula A, Camacho LAB, Marzochi MC, Xavier S, Silva AVM, Jansen AM 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop, São Paulo*; 45: 79-83.

- Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Ready PD, Davies CR 1999. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *Med Vet Entomol* 13: 209-211.
- Carvalho GM, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima AC, Contijo CM 2008. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8: 407-414.
- Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Araujo-Pereira T, Britto C, Brazil RP, Brandão-Filho S. 2010. Natural *Leishmania infantum* in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop* in press.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussem MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V 1987. "A Ribosomal RNA Gene Probe Differentiates Member Species of the *Anopheles gambiae* Complex". *Am. J. Trop. Med. Hyg. USA*, 37, p.37-41.
- Costa SM. 2005. *Estudos de populações braseleiras de lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psycodidae: Phlebotominae) importante transmissor de Leishamiose Tegumentar Americana.* (Dissertação de Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Costa JML, Balby ITA, Rocha JES, Silva AR, Rebêlo JMM, Ferreira LA, Gama MEA, Branco MRFC, Burattini MN, Soares NJ 1998. Estado comparativo da Leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes de áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 25: 115-123
- Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)* and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 149-153.

- Deane LM 1956. *Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará*. Serviço Nacional de Educação Sanitária, 126 pp.
- Dorval ME, Cristaldo G, Rocha HC, Alves TP, Alves MA, Oshiro ET, Brazil RP, Galati EA, Cunha RV 2009. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 695-702.
- Falqueto A 1995. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo, PhD Thesis, Fiocruz, Rio de Janeiro, 84 pp.
- Forattini OP 1943. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares no estado de São Paulo. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 7: 157-168.
- Forattini OP 1960. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). *Arq Hyg Sao Paulo* 25: 209-215.
- Forattini OP 1973. *Entomologia Médica*, vol. 4, Editora Edgard Blücher & Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 658 pp.
- França F, Lago EL, Tada S, Costa JM, Vale K, Oliveira J, Costa MA, Osaki M, Cheever L, Netto EM, Barretto AC, Johnson WD, Marsden PD 1991. An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 169-174.
- Galati EAB 2003. Morfologia e taxonomia. In *Flebotomíneos do Brasil*, EF Rangel, R Lainson (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-176.
- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espínola MA, Rocha HC, Garcia WB 1996. Study of the phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso state, Brazil. *Rev Saude Publica* 30: 115-128.

- Grimaldi G Jr, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* Jul;6(3):230-50.
- Hoch A, Ryan L, Vexenet JA, Rosa AC, Barretto AC 1986. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomines in mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl.): BI 44.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE 2009. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 28 de setembro de 2009.
- Ishikawa EAY, Ready PD, de Souza AA, Day JC, Rangel EF, Davies CR, Shaw JJ 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationship between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the rain-forest region of Amazônia and Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 339-345.
- Killick-Kendrick R 1979. Biology of *Leishmania* in Phlebotomine Sandflies. Lumsden, W. A. R., Evans, D. A., Ed. *Biology of the Kinetoplastida London: Academic Press*; 2, p.395-460.
- Lainson R 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 569-596.
- Lainson R 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond Series B* 321: 389-404.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* Nov 14;199(1135):309-20.
- Lainson R, Shaw JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In WHR Lumsden, DA Evans, *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 2, Academic Press, London, p. 1-116.

- Lainson R, Braga RR, Souza AA, Povoá MM, Ishihawa EAY, Silveira FT 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n, a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasit Hum Comp* 64: 200-207.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EAY 1990. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi*. *Ann Parasitol Hum Comp* 65: 282-284.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds.), *Topley & Wilson's microbiology & microbiol infections*, 9th ed., vol. 5, *Parasitology*, Arnold, London, p. 242-266.
- Lainson R & Shaw JJ 2005. Chapter 17. New World leishmaniasis. In: Cox F. E. G., J. P. Kreier & D. Wakelin, eds. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, Sydney, Auckland; 313–349 p.
- Lainson R, Rangel EF 2003. *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. p:311-336. In *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Rangel & Lainson, Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 811-827.
- Lewis DJ & Ward RD 1987. Transmission and vectors. In: Peters, W. and Killick-Kendrick, R. Ed. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press. v.I, p.235-257.
- Librado P, Rozas J 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of

- Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 623-631.
- Maciel GB, Missawa NA 2009. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in indigenous villages in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42:597-602.
- Marcondes CB, Day JC, Ready PD. 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91:725-6.
- Margonari CS, Dias-Forte CL, Dias ES 2004. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *J Med Entomol* 41: 187-192.
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 123-137.
- Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA 2006. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evolutionary Biology*, 6:85.
- Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GE, Azevedo RV, Barbujani G, Peixoto AA. 2008. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evolutionary Biology*, 8:141.
- Missawa NA, Lima GB 2006. Spatial distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* Jul-Aug;39(4):337-40.
- Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Filho GH, Espínola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Serafini LN, Santos D 1995. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no Município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – estudos na população humana. *Soc Brasil Méd Trop*; 28(3), p.185-193.

- Oliveira MR, Macedo VO, de Carvalho EM, Barral A, Marotti JG, Bittencourt A, de Abreu MV, Orge M de La G, Lessa Hde A, Marsden PD 1995. An evolutionary study of mucosal leishmaniasis (a 7 to 17-year follow-up) due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 325-332.
- Organização Mundial de Saúde [online]. The disease and its epidemiology. [acesso em 29 nov. 2008]. Disponível em:
http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/em/index.htm.
- Passos VNA, Silva RE, Falcão AL 1991. Fauna flebotomínica de municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 24 (Supl. 11): 107.
- Pessôa SB, Coutinho JO 1941. Infecção natural e experimental dos flebotomos pela *Leishmania braziliensis* no estado de São Paulo. *Hospital* 20: 25-35.
- Peterson AT, Shaw J 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions and climate change effects. *Int J Parasitol* 33: 919-931.
- Pimenta PFP, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL 1994. The vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:9155-9159.
- Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN 2003. Interação leishmania hospedeiro invertebrado, p. 275-289. *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Rangel & Lainson, Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Pita-Pereira D, Souza, GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF 2009. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Am J Trop Med Hyg* 80: 593-595.

- Queiroz RG, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Pessoa FA, Souza RN, David JR 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Ann J Trop Med Hyg* 50: 693-698.
- Rangel EF 1995. Tropical Diseases, Society and the Environment. *SAREC Documentation/TDR*; p.103-110.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA 1986. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 431-438.
- Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED 1990. Studies on sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 39-45.
- Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo ACR 1996. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 43-50.
- Rangel EF & Lainson R 2003. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana, p. 291-336. *Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Rangel & Lainson, Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Rangel EF, Vilela ML 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. Dec;24(12):2948-52.
- Rangel EF, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Nov*; 104(7): 937-954.
- Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Ward D 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977) (Diptera: Psychodiade), the major vector to man of

Leishmania braziliensis guyanensis in north-eastern Amazonian Brazil. *Bull Entomol Res* 76: 21-40.

Ready PD, Day JC, Souza AA, Rangel EF, Davies CR 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodiade) incriminated in the peridomestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull Ent Res* 87: 187-195.

Ready PD, Souza AA, Rebêlo JMM, Day JC, Silveira FT, Campbell-Lendum D, Davies CR, Costa JML 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south-east boundary of Amazonian Brazil. *Bull Entomol Res* 87: 187-195.

Rebêlo JMM, Oliveira ST de, Silva FS, Barros VLL, Costa JML 2001. Sandflies (Díptera: Psychodidae) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Rev. Brasil. Biol;* 61(1), p.107-115.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LA, Silva AR 2000. Phlebotominae (Díptera: Psychodidae) de Lagoas município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I – Riqueza e abundância relativa das espécies em áreas de colonização recente. *Rev Soc Brás Méd Trop;* 33(1), p.11-19.

Rebêlo JMM, Rocha VR, Moraes JLP, Alves GA, Leonardo FS 2009. Distribuição de *Lutzomyia whitmani* em fitorregiões do estado do Maranhão, Brasil. *Rev Saúde Pública;* 43(6):1070-1074.

Rey L 2001. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Ryan L, Phillips A, Milligan P, Lainson R, Molyneux DH, Shaw JJ 1986. Separation of female *Psychodopygus wellcomi* and *P. complexus* (Diptera, Psychodidae) by cuticular hydrocarbons. *Act Trop;* 43:11-16

Ryan L, Vexenet A, Marsden PD, Lainson R 1990. The importance of rapid diagnoses of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sand fly vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 786.

- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Ent* 12: 315-317.
- Santos SO, Arias JR, de Paiva Hoffmann M, Furlan MB, Ferreira WF, Pereira C, Ferreira L 2003. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*, Corumbá, Mato Grosso do Sul state. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 633-634.
- Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV 2010. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica* 113(1):84-87.
- Schallig HD, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM 2007. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis. Fall*;7(3):387-93.
- Shaw J 2007. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini- review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 541-547.
- Shaw 2008. How climatic and environmental variations affect the eco-epidemiology of the leishmaniasis and their control. III Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores, 13pp.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 7:511.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G 1988. Experimental infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 83:141.
- Souza NA, Vilela ML, Andrade-Coelho CA, Rangel EF 2001. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest Reserves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 319-324.

- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 759-765.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Peixoto AA, Rangel EF 2005. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *J Med Entomol* 42(6): 986-92.
- Sudia WR & Chamberlain RW 1962. Battery operated light-trap: an improved model. *Mosquito News*; 22, p.126-129.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*; v. 24, p. 1596-1599.
- Taniguchi HH, Tolezano JE, Corrêa FMA, Morales RAP, Veiga RMO, Marassa AM 1991. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I. Composição da Fauna flebotomínica no Município de São Roque, região de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 51:23-30
- Teodoro U, Salvia-Filho VL, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, Verzignassi TG 1993. Flebotomíneos em áreas de transmissão de leishmaniose na região norte do estado do Paraná - Brasil: variação sazonal e atividade noturna. *Rev Saude Publica* 27: 190-194.
- Teodoro U, Silveira TG, dos Santos DR, dos Santos ES, dos Santos AR, de Oliveira O, Kuhl JB, Alberton D 2003. Influence of rearrangement and cleaning of the peridomiliary area and building disinsectization on sand fly population density in the municipality of Doutor Camargo, Paraná state, Brazil. *Cad Saude Publica* 19: 1801-1813.
- Vexenat JA, Barretto AC, Rosa AC 1986. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 125-126.

- Vilela ML, Azevedo ACR, Costa SM, Costa WA, Silva DM, Grajauskas AM, Moreira-de-Carvalho B, Paes LRDNB, Kozlowsky D, Rangel EF 2008. Sand fly survey in the influence area of Peixe Angical Hydroelectric Plant, state of Tocantins, Brazil. 6th International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Lima, 95 pp.
- Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol* May;37(6):589-93.
- Volf P, Myskova J 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol* 23: 91-92.
- Young DC, Duncan NA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Ann Entomol Institut* 54: 1-881.

ANEXOS

Anexo 1 – Valor da distância p calculada entre os haplótipos de *L. (N.) whitmani* e demais espécies utilizadas como grupo externo.

HAPLÓTIPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 HAP-1																				
2 HAP-2	0,004																			
3 HAP-3	0,004	0,007																		
4 HAP-4	0,018	0,021	0,021																	
5 HAP-5	0,011	0,007	0,014	0,014																
6 HAP-6	0,032	0,035	0,035	0,021	0,035															
7 HAP-7	0,032	0,035	0,035	0,014	0,028	0,007														
8 HAP-8	0,028	0,032	0,032	0,025	0,032	0,018	0,018													
9 HAP-9	0,039	0,042	0,042	0,021	0,035	0,014	0,007	0,025												
10 HAP-10	0,035	0,039	0,039	0,018	0,032	0,004	0,004	0,021	0,011											
11 HAP-11	0,035	0,039	0,039	0,018	0,032	0,011	0,004	0,021	0,011	0,007										
12 HAP-12	0,035	0,039	0,039	0,046	0,046	0,025	0,032	0,035	0,035	0,028	0,035									
13 HAP-13	0,032	0,035	0,035	0,042	0,042	0,021	0,028	0,032	0,032	0,025	0,032	0,004								
14 HAP-14	0,035	0,039	0,039	0,046	0,046	0,025	0,032	0,035	0,035	0,028	0,035	0,007	0,004							
15 HAP-15	0,032	0,035	0,035	0,042	0,042	0,028	0,028	0,032	0,032	0,032	0,032	0,011	0,007	0,007						
16 HAP-16	0,039	0,042	0,042	0,049	0,049	0,028	0,035	0,039	0,039	0,032	0,039	0,011	0,007	0,011	0,014					
17 HAP-17	0,035	0,039	0,039	0,018	0,032	0,011	0,004	0,021	0,011	0,007	0,007	0,035	0,032	0,035	0,032	0,039				
18 HAP-18	0,035	0,039	0,039	0,018	0,032	0,011	0,004	0,021	0,011	0,007	0,007	0,035	0,032	0,035	0,032	0,039	0,007			
19 HAP-19	0,035	0,039	0,039	0,018	0,032	0,011	0,004	0,021	0,011	0,007	0,007	0,035	0,032	0,035	0,032	0,039	0,007	0,007		
20 <i>L. hernandezi</i>	0,053	0,056	0,049	0,049	0,049	0,046	0,039	0,042	0,039	0,042	0,042	0,049	0,046	0,049	0,046	0,053	0,042	0,042	0,042	
21 <i>L. panamensis</i>	0,161	0,165	0,158	0,165	0,165	0,154	0,154	0,147	0,151	0,158	0,158	0,158	0,154	0,158	0,154	0,154	0,154	0,158	0,158	0,151

Anexo 2 – Matriz Binária construída a partir das análises dos géis de RAPD-PCR. Diferenciando os dados obtidos por cada *primers*.

	Primer 6	Primer 4	Primer 1	Primer 3
1B	101011010101100011000100000011010100101111001000001101110000011000000010010101100011			
2B	11010011000000000100010001101100110010101000000000110110010001100001011001011111011			
3B	1000100100101010000011001100110001000000000000001101100111001000101000110011101001010			
1M	110110001010110001000100000011000110010001010000000001001100000110001000010101000000			
2M	110000101011110011100011001111000110001001100010000001111011000110001001010101111010			
3M	11000011101110000100000101001100110000011100000000001001100001000001000000101000010			
1I	10000000000100000000000000000000110000110000001000000001111010000000001000010101010010			
2I	100000010101000101000100111011000111011000100000000011100101000010100000110101011010			
3I	100000010011000000011100000111000100001011100000000011001101100110100000000101010010			
1P	000011000000001001000100000111001100101011001000000011110111010110000000110101000000			
2P	000011001010011001100100101001000100100010000000000011101100100110000000110101010110			
3P	000111010001110100000100110011100100110010000100000000110011000100100010110000001111			