

SIMONE MIRANDA DA COSTA

**ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Lutzomyia*  
(*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE),  
IMPORTANTE TRANSMISSOR DE AGENTES DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do título de  
“Magister Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837e  
2005

Costa, Simone Miranda da, 1975-

Estudos de algumas populações brasileiras de  
*Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Diptera:  
Psychodidae: Phlebotominae), importante transmissor  
de agentes da leishmaniose tegumentar americana /  
Simone Miranda da Costa. – Viçosa: UFV, 2005.  
x, 72f: il.; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Mara Garcia Tavares.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografias.

1. *Lutzomyia* – Variabilidade genética. 2. *Lutzomyia* –  
Epidemiologia. 3. Eletroforese de isoenzimas. I. Univer-  
sidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.771046

SIMONE MIRANDA DA COSTA

**ESTUDOS DE ALGUMAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Lutzomyia***  
**(*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE),**  
**IMPORTANTE TRANSMISSOR DE AGENTES DA LEISHMANIOSE**  
**TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 29 de julho de 2005

---

Elizabeth Ferreira Rangel  
(Co-orientadora)

---

Lucio Antônio de Oliveira Campos  
(Conselheiro)

---

Gustavo Martins Aguiar

---

Rubens Pinto de Mello

---

Mara Garcia Tavares  
(Orientadora)

Dedico,

*À Alzelina Vicente da Costa;*  
*Aos meus irmãos Fábio, Mônica e Fabiano;*  
*As minhas tias*  
*Aos amigos.*

*“Portanto, procurai com zelo os melhores  
dons; e eu vos mostrarei um caminho ainda  
mais excelente”.*

*I Co12:31*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por saber que sempre Ele está cuidando de mim;

À minha família pelo amor, apoio e incentivo, demonstrados durante todas as escolhas que faço na minha vida;

À Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Ferreira Rangel, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, não somente pela orientação e dedicação nos ensinamentos, mas também, pelas palavras de apoio e encorajamento nos bons e maus momentos e por poder ter sua amizade construída ao longo desses anos;

À Direção da Pós\_Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela oportunidade de realização do curso;

À Dr.<sup>a</sup> Mara Tavares Garcia, do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, não somente pelas valiosas sugestões e pela orientação mas também pelo apoio demonstrado durante um momento difícil na minha vida;

Ao Prof. Conselheiros Lúcio Antônio de Oliveira Campos e José Cola Zanuncio, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelas sugestões durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Alfredo C. R. 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, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, amigo e companheiro de trabalho, pelas sugestões durante as corridas eletroforéticas, pelo incentivo e dedicação demonstrados durante todos os momentos da realização deste trabalho;

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, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, amigo e companheiro de trabalho, pelas coletas realizadas em Ilhéus (BA), pelo apoio nos estudos taxonômicos, pelo incentivo durante a realização deste trabalho;

À Bióloga e amiga Margarete M. dos Santos Afonso, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela dedicação, incentivo e solidariedade ao longo da realização deste trabalho;

Ao Prof. André de Figueiredo Barbosa, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, amigo e companheiro de trabalho, pelas coletas de flebotomíneos realizadas em Santarém (PA);

À Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Pereira de Oliveira, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela amizade e auxílio nas coletas de flebotomíneos;

Ao Técnico Oswaldo Carvalho da Silva, do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio nas coletas de flebotomíneos;

Ao Biólogo e amigo Cláudio R. V. Meneses, University of California at Davis, Department of Entomology , pelas valiosas sugestões e ajuda durante a análise dos géis;

Ao Biólogo e amigo Wagner Alexandre Costa, da Coordenação de Vigilância de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, pelo incentivo e apoio nos momentos solicitados;

Ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, Chefe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela utilização do laboratório durante as corridas eletroforéticas;

À Tecnologista Andiária Ramos da Silva, do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio nas corridas eletroforéticas;

À Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora de Souza, Responsável pela Coleção de Tripanosomatídeos, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela utilização do laboratório durante algumas corridas eletroforéticas;

Ao estudante de Ciências Biológicas Daniel Motta da Silva, Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses/ Laboratório de Referência em Vigilância Entomológica: Taxonomia e Ecologia de Vetores das Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela elaboração de parte dos mapas;

À toda a 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, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Dr.<sup>a</sup> Nataly Araujo de Souza, a



Prof. Claudia A. Andrade-Coelho pelas palavras de estímulo, amizade e compreensão demonstrados durante toda a realização deste trabalho;

À Ângela Lúcia de Carvalho, Éster Lucia Gomes da Silva e Simone Tavares Marujo, Secretárias do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pela amizade e disposição em ajudar;

À Sra. Maria Paula Aparecida da Costa, Secretária da Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal de Viçosa, pela disposição em ajudar e carinho demonstrado durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Valdenir Bandeira Soares, do Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP/ FIOCRUZ, pelo apoio durante a confecção dos mapas relacionados aos circuitos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana;

À Prof. Helena Hilomi Taniguchi, do Instituto Adolfo Lutz, pelas coletas de flebotomíneos realizadas em Londrina (PA);

Ao Sr. Iorlando Barata, do Instituto Evandro Chagas, pelas coletas de flebotomíneos realizadas em Santarém e em Paragominas (PA);

Aos professores da Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, que muito contribuíram para minha formação;

À estudante de doutorado Simone Patrícia Freitas, da Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela amizade e companheirismo demonstrados durante o período em que vivemos na “república” durante a realização deste estudo;

Aos amigos e colegas das disciplinas cursadas durante o curso de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelo apoio demonstrado durante um momento difícil na minha vida;

Aos colegas Allan Martins da Silva, Edgar Lessa Crusoé, João Cezar, Lindemberg Caranha de Souza, Luiz Oswaldo, Getúlio Dornelles Souza, a Prof. Fátima dos Santos, Joana Martins de Sena, Flávia Martins, dos Núcleos de Entomologia e das Secretarias Estaduais de Saúde, dos Estados do Paraná, Bahia, Mato Grosso do Sul, Ceará, Rio Grande do Sul, Rondonia, Tocantins, Goiás, respectivamente, e ao Prof. José Dilermando Andrade Filho, do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz, ao Dr. José Manuel Macário Rebêlo do Laboratório de Entomologia e Vetores do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, pelas informações sobre a distribuição de *L. (N.) whitmani*, por municípios brasileiros;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de Mestrado;

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo suporte financeiro de parte destes estudos;

Ao Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica/ PAPES III, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo suporte financeiro de parte destes estudos.

## ÍNDICE

|  |       |      |
|--|-------|------|
| RESUMO   | ----- | XI   |
| ABSTRACT   | ----- | XIII |
| Introdução geral   | ----- | 1    |
| Leishmanioses  | ----- | 1    |
| Flebotomíneos e a espécie <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.</i>   | ----- | 5    |
| Referências bibliográficas   | ----- | 12   |
| Objetivos  | ----- | 20   |
| Objetivo geral   | ----- | 20   |
| Objetivos específicos  | ----- | 20   |
|  |       |      |
| Capítulo 1 <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e a eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Amazônia. Contribuição ao conhecimento dos flebotomíneos vetores do Estado do Acre | ----- | 21   |
| Introdução   | ----- | 22   |
| Materiais e Métodos  | ----- | 23   |
| Resultados   | ----- | 24   |
| Discussão  | ----- | 25   |
| Referências bibliográficas   | ----- | 28   |
|  |       |      |
| Capítulo 2: A Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. Participação de <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)   | ----- | 30   |
| Introdução   | ----- | 31   |
| Materiais e Métodos  | ----- | 32   |
| Resultados   | ----- | 33   |
| Discussão  | ----- | 36   |
| Referências bibliográficas   | ----- | 40   |

|  |    |
|--|----|
| Capítulo 3: Estudo da variabilidade genética entre populações de <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) através da eletroforese de isoenzimas ----- | 46 |
| Introdução -----   | 47 |
| Materiais e Métodos -----  | 48 |
| Resultados -----   | 51 |
| Discussão -----  | 57 |
| Tabelas -----  | 61 |
| Referências bibliográficas -----   | 65 |
| Conclusões gerais -----  | 69 |

## RESUMO

COSTA, Simone Miranda da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.  
**Estudos de algumas populações brasileiras de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), importante transmissor de agentes da leishmaniose tegumentar americana.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadora: Elizabeth Ferreira Rangel. Conselheiros: Lucio Antônio de Oliveira Campos e José Cola Zanuncio.

*Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) possui uma ampla distribuição no território brasileiro, sendo registrada em todas as regiões geográficas e, no Continente Americano, a espécie foi assinalada na Guiana Francesa, no Paraguai, no Peru e na Argentina. No Brasil está incriminada como vetora de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*. Considerando a vasta distribuição geográfica, aspectos diferenciados da biologia e, a possível veiculação de duas leishmânias dermatrópicas, o objetivo do trabalho foi ampliar os conhecimentos sobre *Lutzomyia (N.) whitmani* s.l., importante transmissor de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, determinando a distribuição espacial deste flebotomíneo associada aos circuitos epidemiológicos de LTA, bem como avaliar a competência vetorial, a variabilidade e o grau de estruturação genética de algumas populações brasileiras. Foram elaborados dois mapas temáticos que, por sobreposição, permitiram visualizar o registro de *L. (N.) whitmani* s.l. em municípios associados aos circuitos epidemiológicos da LTA e aos diferentes tipos de vegetação. *L. (N.) whitmani* s.l. foi registrada em 720 municípios brasileiros, de vinte e seis unidades federadas, não tendo registro, apenas, em Santa Catarina, habitando diferentes tipos de vegetação e associados a variados climas. A discussão sobre *L. (N.) whitmani* s.l. representar um complexo de espécies está baseada em aspectos da sua biologia e da competência vetorial, que revelam sua capacidade em transmitir duas leishmânias distintas e ter

hábitos diferenciados com a ocupação de diferentes ecótopos. Através da análise de isoenzimas, foi sugerido que as populações de *L. (N.) whitmani s.l.* das áreas estudadas (Paragominas, Santarém, Londrina e Ilhéus) representariam uma única espécie, com grandes chances de sofrer subdivisões em decorrência da evolução. Observou-se que a população do Município de Paragominas se destacou das demais por apresentar uma maior diferenciação genética, o que contribuiu para a formação de um ramo isolado na análise de agrupamentos. Numa visão epidemiológica macro-territorial, independente de estar transmitindo *Leishmania (Viannia) braziliensis* ou *Leishmania (Viannia) shawi*, sugere-se *L. (N.) whitmani s.l.* como o mais importante transmissor da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

## ABSTRACT

COSTA, Simone Miranda da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July of 2005.  
**Studies of some Brazilian populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae), important transmitter of agents of american cutaneous leishmaniasis.** Adviser: Mara Garcia Tavares. Co- Adviser: Elizabeth Ferreira Rangel. Committee members: Lucio Antônio de Oliveira Campos and José Cola Zanuncio.

*Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho 1939) has a large distribution in Brazil, being registered in all geographic regions. In American continent this specie was found in French Guyana, Paraguay, Peru and Argentina. In Brazil it's incriminated as a vector of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) shawi*. Considering the large geographic distribution, the different aspects of biology and the possibility of *Leishmania* spp. transmission, the objective of the present study was to increase the knowledge about *Lutzomyia (N.) whitmani* s.l., an important vector of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil, determining its geographic distribution in association with epidemiologic circuits of LTA, as well as to evaluate the vectorial competence, the genetic variability and the structure level of some *L. (N.) whitmani* s.l. Brazilian population. Two maps were created which enabled one to visualize the distribution of *L. (N.) whitmani* s.l. in the different Brazilian municipalities in association with the different types of vegetation and active transmission of ACL. *L. (N.) whitmani* s.l. was registered in 720 Brazilian municipalities, been verified in 26 federal units, hadn't been registered only, in state of Santa Catarina, inhabiting different kinds of vegetation and associated with different climates. The discussion about *L. (N.) whitmani* s.l. representing a species complex is based on aspects of its biology and vectorial competence, that reveal its capacity in transmit two distinct parasites and has different habits living in diversified habitats. The isoenzymatic analysis indicated that the *L. (N.) whitmani* s.l. populations of the study areas (Paragominas, Santarém, Londrina and Ilhéus) represent only one species with great chances of suffer

subdivisions due to the course of evolution. We observed that the population of Paragominas municipality was detached from others by presenting the biggest genetic differentiation, which contributed for the formation of an isolated bunch in the grouping analysis. In an epidemiologic macro-territorial view, independent of being transmitting *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) shawi*, *L. (N.) whitmani s.l.* can be suggested as the most important vector of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil.



## **Introdução Geral**

### **Leishmanioses**

As leishmanioses são zoonoses causadas por parasitos flagelados heteroxenos, do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Estas incluem várias doenças devido, sobretudo, à variedade de parasitos que afetam diferentes populações e à relação destes com vetores e reservatórios específicos (Peters & Killick-Kendrick 1987).

As leishmanioses, como protozoonoses humanas, têm despertado especial atenção devido a sua importância médica, econômica e distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da América, África, Índia e nos países das margens do Mediterrâneo.

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (2004), as leishmanioses ocorrem em 88 países e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles.

As leishmanioses no Velho Mundo podem se apresentar como visceral e cutânea. Essa última existindo em ambiente rural e urbano. A forma rural é encontrada no norte da África, Oriente Médio, Ásia Central e Oriental e seu agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) major* Yakimoff & Schokhor, 1914. *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus caucasicus*, *Phlebotomus mongolensis* são consideradas vetores, entretanto, o *P. papatasi* é a mais importante na transmissão da doença ao homem (Lainson 1982, Schlein & Jacobson 2002, Wasserberg et al. 2003).

Na Índia e nas regiões Central e Sudeste da Ásia, a forma urbana é denominada botão-do-oriental, tendo como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) tropica* Wright, 1902, sua transmissão, provavelmente, é intradomiciliar pois o vetor incriminado, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917, está associado à habitação humana, mostrando expressivo grau de antropofilia (Killick-Kendrick 1990).

A leishmaniose visceral, no Velho Mundo, apresenta três tipos epidemiológicos caracterizados como: leishmaniose visceral do Mediterrâneo e Ásia Central, da África Central e do Sudão.

A leishmaniose visceral do Mediterrâneo e Ásia Central, encontrada na bacia do Mediterrâneo, onde seu agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 tendo o cão como importante reservatório. O principal vetor é *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newsted, 1911 seguido por *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921 (Killick-Kendrick, 1990). O segundo padrão de transmissão está relacionado àquele que ocorre na África Central (Sudão, Etiópia e Quênia). Essa doença não incide em cães mas, apenas em indivíduos adultos, principalmente do sexo masculino. No Sudão, *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903, tem sido isolada do principal vetor *Phlebotomus (Larroussius) orientalis* Parrot, 1936; todavia, *Phlebotomus (Synphlebotomus) martini*, Parrot, 1936 pode ser considerado vetor em outras regiões. O calazar indiano (leishmaniose visceral) é considerado, até o momento, como uma antroponose, tendo em vista os hábitos peridomésticos da espécie vetora, *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* Annandale & Bruunetti, 1908 e a presença do parasito, *Leishmania (Leishmania) donovani*, no sangue periférico de pacientes. A doença é, altamente, endêmica e por isso, em certas áreas, ocorrem surtos epidêmicos a cada 10 a 15 anos (Lainson 1982).

No Novo Mundo, as leishmanioses são divididas em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Cerca de vinte e duas espécies de *Leishmania* são encontradas infectando o homem (Grimaldi Júnior et al. 1991, Shaw 1994, Asford 2000, Silveira et al. 2002) e destas, quinze ocorrem nas Américas (Shaw 1994, Silveira et al. 2002).

Na LTA existe uma variedade de formas caracterizadas, quanto à clínica e patologia, como Leishmaniose Cutânea (LC), a qual produz exclusivamente lesões limitadas, ulcerosas ou não; Leishmaniose Mucocutânea (LMC), forma que compromete as mucosas do nariz, boca e faringe e a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), com formas cutâneas disseminadas, que se apresentam em indivíduos anérgicos ou em pacientes que haviam sido tratados de LVA.

A visceral (LVA) compromete fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides, onde os parasitos instalados levam à hiperplasia e hipertrofia desses órgãos.

A LTA é causada por leishmânias dermatrópicas, dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Diferentes associações em natureza entre hospedeiro invertebrado e parasito podem ser observadas no segundo subgênero. Essas são cadeias epidemiológicas distintas restritas a regiões geográficas. Nesse sentido, as leishmânias do subgênero *Viannia* têm sua transmissão associada com *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia migonei* França, 1920, *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* Pinto, 1926, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexa* Mangabeira, 1941, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *ayrozai* Barretto & Coutinho, 1940, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *paraensis* Costa Lima, 1941, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *squamiventris squamiventris* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia* (*Trichophoromyia*) *ubiquitalis* Mangabeira, 1942, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *antunesi* Coutinho, 1939, *Lutzomyia* (*Viannamyia*) *tuberculata* Mangabeira, 1941 e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani s.l.* Antunes & Coutinho, 1939 (Lainson & Shaw 1998).

O agente etiológico da forma clínica visceral é a *Leishmania* (*Leishmania*) *infantun chagasi* Cunha & Chagas, 1937 sendo *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 comprovadamente, incriminada pela transmissão (Deane 1956, Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003). Entretanto, no Município de Corumbá (MS), *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* Mangabeira, 1938 tem sido sugerido como vetor de Leishmaniose Visceral Americana (Santos et al. 1998).

Classicamente, as leishmanioses têm sido consideradas como zoonoses de animais silvestres. No Brasil, esse aspecto estaria restrito à região da floresta Amazônica e a Mata Atlântica e ainda, remanescente em áreas de Cerrado.

Alterações do ambiente, em várias regiões do Brasil, vêm modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses (Lainson 1983, 1988, Rangel 1995, Walsh et al. 1993). O crescimento migratório, aliado ao processo de

assentamentos mal planejados nas últimas décadas, tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco de infecção por *Leishmania* em consequência do desequilíbrio ecológico. Esta situação está bem evidente em algumas áreas periurbanas de grandes cidades, inclusive em residências, na periferia de algumas capitais de estados, provavelmente pela adaptação de flebotomíneos vetores a áreas impactadas.

A incidência das leishmanioses no Brasil tem aumentado, nos últimos vinte anos, em, praticamente, todos os estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionada ao processo predatório de colonização. Nos últimos dois anos, o Ministério da Saúde registrou 35 mil novos casos de leishmaniose tegumentar no país.

Em natureza, a transmissão de *Leishmania* sp. ao hospedeiro vertebrado ocorre pela inoculação das formas infectivas (promastigotas metacíclicas) através da picada das fêmeas dos flebotomíneos. Em geral, as leishmânias apresentam duas formas distintas em seu ciclo de vida: a forma promastigota que é flagelada e encontrada no trato digestivo da fêmea do flebotomíneo vetor e a amastigota, que se situa no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de várias espécies de mamíferos (Lainson et al. 1979).

Certos mamíferos são apontados como importantes hospedeiros para a maioria das espécies de *Leishmania*. Os mamíferos silvestres ou domésticos, das ordens Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla funcionam como hospedeiros vertebrados ou reservatórios e servem como fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, para a manutenção do ciclo silvestre das espécies de *Leishmania*.

## **Flebotomíneos e a espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l.**

Os flebotomíneos são dípteros de pequeno porte que, provavelmente, surgiram durante o período Cretáceo Inferior (Lewis 1982). Pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, são vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais como bactérias do gênero *Bartonella*, numerosos arbovírus e, especialmente, protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos (Forattini 1973).

A subfamília Phlebotominae apresenta três gêneros no Novo Mundo: *Lutzomyia* França, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948 (Young & Duncan 1994). No Velho Mundo, são aceitos também três gêneros: *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987.

Aproximadamente, 800 espécies de flebotomíneos foram descritas no Mundo, entretanto, somente algumas espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* foram incriminadas como transmissoras de leishmanioses.

Dentre as espécies de flebotomíneos descritas nas Américas, cerca de 30 são incriminadas ou suspeitas de transmitirem as leishmanioses. No Brasil, estes dípteros estão presentes em todo o território nacional sendo conhecidos, popularmente, como mosquito-palha, cangalhinha, furupa, tatuquira e biriguí (Killick-Kendrick 1990, Dedet 1993, Santos et al. 1998, Cipa Group 1999, Silva & Grunewald 1999).

O subgênero *Nyssomyia* Barretto 1962, ao qual pertence *L. (N.) whitmani* s.l., objeto de estudo do presente trabalho, é de grande importância para a compreensão da epidemiologia da LTA nas Américas. A sua distribuição geográfica vai do México a Argentina, com sete espécies implicadas na transmissão da LTA, em áreas da América do Sul e Central (Dedet 1993, Marcondes et al. 1998).

*L. (N.) whitmani* foi descrita por Antunes & Coutinho, em 1939 como *Flebotomus whitmani* em homenagem ao Dr. Whitman, da Fundação Rockefeller, entidade que colaborava com o governo brasileiro no Serviço da Febre Amarela. A nova espécie foi descrita com base em exemplares machos e fêmeas coletados em Ilhéus, Estado da Bahia. Até 1939, era confundida com *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. No território brasileiro, essa espécie tem sido registrada em todas as regiões geográficas e, no Continente Americano, foi assinalada também na Guiana Francesa, no Paraguai, no Peru e na Argentina (Young & Duncan 1994).

A participação de *L. (N.) whitmani s.l.* na cadeia epidemiológica da LTA, restringe-se ao território brasileiro, sendo seu primeiro relato como vetor no Estado de São Paulo quando foi encontrada infectada por flagelados, possivelmente *Leishmania* (Pessoa & Coutinho 1941).

A biologia de algumas espécies de flebotomíneos foi estudada no Estado de São Paulo, sendo *L. (N.) whitmani s.l.* encontrada freqüentemente em zonas florestais desmatadas (Barretto 1943). Segundo Pessoa & Coutinho (1941), *L. (N.) whitmani s.l.* é muito antropofílica, invadindo domicílios e picando o homem.

Nas décadas de 30 e 40, do século XX, durante o processo de colonização das Regiões Sul e Sudeste, a transmissão de leishmaniose esteve associada a *L. (N.) whitmani s.l.* até, então, com comportamento silvestre (Forattini 1973). Essa espécie habitava as matas e picava o homem e os animais domésticos quando nelas penetravam ou quando as habitações se localizavam no interior ou na imediata vizinhança das mesmas (Barretto 1943). Outros estudos sobre a ecologia de *L. (N.) whitmani s.l.* revelaram aspectos relativos a criadouros naturais, variação mensal, alta densidade da espécie e sua adaptação ao domicílio (Forattini 1960).

*Lutzomyia. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani s.l.* foram as espécies predominantes durante a derrubada da floresta primária, (Forattini 1960). Entretanto, com o aumento da área cortada, *L. (N.) whitmani s.l.* apresentava tendência de desaparecer, sugerindo que esta espécie seja mais dependente da floresta primária que *L. (N.) intermedia*. Por outro lado, *L. (N.) whitmani s.l.* era

encontrada freqüentemente, em casas próximas à floresta, todas as épocas do ano. Na Região Sudeste essa espécie pode ser capturada em todos os meses do ano (Barretto 1943).

No Sudeste brasileiro, *L. (N.) whitmani s.l.* foi associada no ciclo de transmissão de *Leishmania (V.) braziliensis* no Estado de Minas Gerais, em Caratinga e no Estado do Espírito Santo, em área montanhosa de Afonso Cláudio (Mayrink et al. 1979, Falqueto 1995).

A área endêmica de LTA determinada por *L. (V.) braziliensis*, mostram predominância de *L. (N.) whitmani s.l.* em São Paulo, no Município de São Roque (Taniguchi et al. 1991), com maior freqüência mensal nos meses mais quentes do ano (Taniguchi & Tolezano 1988). Essa espécie foi registrada em reservas de Mata Atlântica e em ambiente peridomiciliar de residências próximas à floresta (Souza et al. 2001). Em estudos realizados em áreas de transmissão de LTA, em ambiente rural no Rio de Janeiro, mostraram a presença de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani s.l.* praticando antropofilia no peridomicílio e na mata mais próxima. No peridomicílio predomina a primeira espécie, enquanto na mata predomina a segunda. Foi levantada a hipótese de que *L. (N.) whitmani s.l.* estaria compartilhando com *L. (N.) intermedia* na transmissão de *Leishmania (V.) braziliensis*, no mesmo nicho ecológico. Estes autores verificaram que *L. (N.) whitmani s.l.* pode estar presente em todos os meses do ano, porém com maior freqüência de ambas as espécies nos meses com temperaturas mais baixas (Souza et al. 2002).

Na Região Sul, *L. (N.) whitmani s.l.* está, possivelmente, associada à transmissão de LTA no Estado do Paraná. Recentemente, estudos realizados ao Norte do estado demonstraram *L. (N.) whitmani s.l.* como predominante, além da infecção natural da espécie por *L. (V.) braziliensis* (Luz et al. 2000).

As áreas de transmissão de LTA no Nordeste estudadas sugere que *L. (N.) whitmani s.l.* seja a transmissora de *L. (V.) braziliensis*. Essa espécie apresenta, nos Estados da Bahia e Ceará hábitos semelhantes ao apresentado para a Região Sudeste: alto grau de antropofilia, e adaptação ao ambiente domiciliar (Barretto et

al. 1982, Vexenat et al. 1986, Azevedo & Rangel 1991). No Ceará, esse flebotômíneo foi encontrado com infecção natural por parasitas tipados por DNA como pertencentes a *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Azevedo et al. 1990). Posteriormente, novas infecções foram encontradas e a caracterização dos parasitas, após isolamento, confirmou tratar-se de *L. (V.) braziliensis* (Queiroz et al. 1994). Outras evidências que apontavam esse flebotômíneo como o principal transmissor na região, estavam relacionadas à sua alta densidade e elevado grau de antropofilia (Azevedo & Rangel 1991, Queiroz et al. 1994).

No Estado da Bahia, *L. (N.) whitmani s.l.* foi encontrada com infecção natural por *L. (V.) braziliensis* em Três Braços (Hoch et al. 1986). Esse achado associado à alta incidência desse flebotômíneo nas habitações e áreas peridomiciliares permitiu levantar a hipótese da ocorrência de um ciclo de transmissão no ambiente domiciliar (Ryan et al. 1990). Em Ilhéus, *L. (N.) whitmani s.l.* foi sugerida como transmissora de LTA, considerando sua absoluta predominância (99,7%), seu elevado grau de antropofilia e sua ocorrência em todos os pontos de coletas de flebotômíneos, a maioria coincidentes com a ocorrência de casos humanos (Azevedo & Rangel 1991).

Na Região Centro-Oeste, no Município de Corguinho (MS) o parasito isolado de todos os pacientes foi identificado como *L. (V.) braziliensis*, através de anticorpos monoclonais e *L. (N.) whitmani s.l.* foi sugerido como vetor por ter sido observado em maior densidade populacional e ser altamente antropofílico (Nunes et al. 1995). Posteriormente, foi relatada a predominância de *L. (N.) whitmani s.l.* em oito dos dez ecótopos selecionados. *L. (N.) whitmani s.l.* esteve presente no solo e na copa das árvores de vários ambientes, sugerindo que essa espécie apresenta hábitos alimentares ecléticos sugando mamíferos e aves. Apesar dessa espécie não ser muito comum no peridomicílio, a sua densidade e antropofilia não deixam dúvidas do seu papel de vetor de LTA na localidade (Galati et al. 1996).

No Norte do Brasil, *L. (N.) whitmani s.l.* apresenta um padrão de comportamento diferenciado. Esse flebotômíneo foi apontado como silvestre, sendo coletado sobre o tronco e copa das árvores de grande porte, além de



apresentar pouca tendência para picar o homem (Lainson et al. 1979). Posteriormente, novos estudos confirmaram tais observações e sugeriram que se a espécie praticasse antropofilia, só o faria em condições especiais (Ready et al. 1986, Shaw et al. 1991). Em 1989, no Pará, Lainson et al. isolaram uma leishmânia de *L. (N.) whitmani s.l.* e, após a caracterização do parasito como *L. (V.) shawi*, sugeriram-no como vetor para o homem.

Ao longo do território brasileiro, considerando diferenças qualitativas relacionadas com antropofilia e domesticidade, Lainson (1988) sugeriu que, *L. (N.) whitmani s.l.* representasse um complexo de espécies crípticas.

A partir de então, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, com o objetivo de elucidar o *status* taxonômico desse flebotomíneo, além de definir sua posição na cadeia de transmissão de LTA no Brasil.

A análise filogenética de caracteres morfológicos e morfométricos, em quatro populações, indicaram a existência de duas linhagens de *L. (N.) whitmani s.l.* no Brasil: uma Amazônica, presente ao Norte e ao Sul do Rio Amazonas, no Estado do Pará, e a outra no Nordeste, nos Estados do Ceará e Bahia (Ilhéus—localidade tipo) (Rangel et al. 1996). Estudos morfométricos, mostraram diferenças significativas para 11 caracteres morfológicos, incluindo o filamento genital e a relação filamento-bomba genital, cujo comprimento é, consistentemente, reduzido nos espécimes da Amazônia. Fragmentos do DNA genômico de espécimes de uma população do Pará foram utilizados no preparo de sondas e, em hidridizações, apenas as populações da Amazônia revelaram fortes sinais de reconhecimento. Mesmo diante de tais evidências, os autores não descartaram a possibilidade da existência de um cline.

Populações de *L. (N.) whitmani s.l.* de várias localidades, foram comparadas através de seqüências de DNA mitocondrial (Ready et al. 1997). A análise filogenética de 16 haplótipos confirmou a existência de uma linhagem da Região Amazônica e outra do nordeste brasileiro (Ready et al. 1997), como sugerido anteriormente (Rangel et al. 1996). Uma terceira linhagem foi identificada no interior semiárido do Brasil e denominada Norte-Sul. Completando esse estudo, Ready et al. (1998) demonstraram uma concordância

entre a existência das três linhagens e três zonas bioclimáticas: a linhagem Amazônica estaria associada à Região de Floresta Tropical Amazônica, a linhagem do Nordeste brasileiro associada à zona de Cerrado do interior do país e a linhagem Norte-Sul associada à Região de Floresta Tropical Atlântica. Essas zonas bioclimáticas existem há 2-3 milhões de anos e baseado, no “relógio molecular” do DNA mitocondrial de flebotomíneos, subentende-se que as linhagens coexistem nessa mesma datação.

Uma quarta linhagem de *L. (N.) whitmani s.l.* foi sugerida no Estado de Rondônia. Entretanto, com base na análise de 31 haplótipos de populações de *L. (N.) whitmani s.l.* das Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, o cladograma mostrou, apenas, duas linhagens: uma das Regiões de Floresta (linhagem de Rondônia, linhagem Amazônia e linhagem Nordestina) e outra Norte-Sul procedente da Zona de Região de Cerrado. Além disso, os achados não sustentavam a hipótese de complexo de espécies crípticas (Ishikawa et al. 1999).

Não foram detectadas diferenças quanto à antropofilia de populações de *L. (N.) whitmani s.l.* dos Estados do Pará, Piauí, Pernambuco e Paraná, contestando as informações anteriores sobre hábitos alimentares deste flebotomíneo na Amazônia, que não o consideravam como antropofílico Campbell-Lenrum et al. (1999).

Em Buriticupu (Amazônia Maranhense), onde têm sido registrados casos humanos de LTA determinados por *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis*; uma situação bastante peculiar foi apontada por Rebêlo et al. (2000). Estes autores sugerem que *L. (N.) whitmani s.l.* é o flebotomíneo envolvido na transmissão da doença, determinada pelos dois parasitos. Nestes estudos, foi verificado que *L. (N.) whitmani s.l.* ocorreu em abundância no ambiente silvestre e também apresentou alta frequência no ambiente domiciliar. Portanto, um padrão amazônico silvestre e outro peridoméstico do vetor estariam ocorrendo numa “zona de transição”.

Populações de *L. (N.) whitmani s.l.* do nordeste e sudeste, confirmaram um resultado prévio sobre a morfometria de populações desses vetores, apresentando mais uma evidência sobre a existência de dois “clusters” de populações

biogeográficas. Entretanto, no mesmo ano, esses autores avaliaram a variabilidade genética de quatro populações biogeográficas de *L. (N.) whitmani s.l.* oriundas de focus conhecidos de leishmaniose cutânea no Brasil, tendo sido evidenciado dois agrupamentos espaciais principais: Corte de Pedra (BA), Ilhéus (BA) e Serra de Baturité (CE) no primeiro grupo e Martinho Campos (MG) no segundo. O aprofundamento da análise mostrou alto grau de homogeneidade na população de Corte de Pedra, mas não nas outras, nas quais uma porcentagem significativa de espécimens deslocou-se do seu foco de origem, sugerindo a existência de um fluxo genético entre as linhagens Norte-Sul/ Norte-leste e Ilhéus/ Serra de Baturité, que poderia ser responsável por duas linhagens geográficas (Margonari et al. 2004).

Considerando a vasta distribuição geográfica de *L. (N.) whitmani s.l.*, aspectos diferenciados de sua biologia e, a possível veiculação de duas leishmânias dermatrópicas, acredita-se que novas investigações poderão, de fato, avaliar a importância epidemiológica desse flebotômico, além de inferir seu *status* taxonômico.

## Referências Bibliográficas

- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 30: 1269-1281.
- Azevedo ACR, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lepes VG 1990. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturite, Ceará State, northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:251.
- Azevedo ACR, Rangel EF 1991. Study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Baturité, Ceará, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(4): 405-410.
- Barretto MP 1943. *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)*. São Paulo (Tese de Livre-Docência da Faculdade de Medicina da USP) 162pp.
- Barretto MP 1962. Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4: 91-100.
- Barretto 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, p. 147.
- Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Ready PD, Davies CR 1999. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 13:209-211.

- Cipa Group 1999. H Bermudes, Dedet JP, Falção AL, Feliciangeli D, Ferro C, Galati EAB, Gomes EL, Herrero MV, Hervas D, Lebbe J, Morales A, Oguzuku E, Perez E, Rangel EF, Sherlock IA, Torres M, Vignes R, Wolff M. (<http://cipa.snv.jussieu.fr/accueil.html>).
- Deane LM 1956. *Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará*. Serviço Nacional de Educação Sanitária, 126 pp.
- Dedet JP 1993. *Leishmania* at leishmanioses du continent américain. *Annales L'Institute Pasteur*, 4: 3-25.
- Falqueto A 1995. *Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo*. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 84pp.
- Forattini OP 1960. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública* 25:209-215.
- Forattini OP 1973. *Entomologia Médica*, 4º Volume (Psychodidae, Phlebotominae) Leishmaniose e Bartonelose. Editira Edgard Blücher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo. 659pp.
- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espínola MA, Rocha HCR, Garcia WB 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 30: 115-128.
- Grimaldi Júnior G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barret TV 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(6): 645-661.

- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl): BI 44.
- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(3):339-345.
- Killick-Kendrick R 1990. Phlebotominae vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4:1-24.
- Lainson R 1982. *Leishmaniasis*, p. 41-103. In J. H. Steele, Handbook, Series in Zoonoses, Parasitic Zoonoses, 1. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida.
- Lainson R 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 569-596.
- Lainson R 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Serie B*, 321: 389-404.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD 1979. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 239-242.
- Lainson R, Braga RR, Souza AA, Povoá M, Ishikawa EAY, Silveira ET 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. N., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 200-207.

- Lainson R, Shaw JJ 1998. New Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In. *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson's, 9<sup>th</sup> Edition, Chapter 13 p. 241-266.
- Lewis DJ 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull Brit Mus (Nat Hist) Ent Ser* 45: 121-209.
- 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, pp235-257.
- 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. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 94(6):623-631
- Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH 1998. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 51-58.
- Margonari CS, Dias-Forte CL, Dias ES 2004. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *Journal of Medical Entomology* 41: 187-192.
- Mayrink W, Willians 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 Parasit* 73: 123-137.
- Nunes VLB, Dorval MEC, RC, Oshiro ET, Noguchi 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. *Rev Soc Brasil Med Trop* 28(3): 185-193.

Organização Mundial Saúde 2004. Internet <http://www.who.ch/ctd/>

Pessoa SB, Coutinho JO 1941. Infecção natural e experimental dos flebotomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. *O Hospital* 20:25-35.

Peters W, Killick-Kendrick R 1987. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, v.I, 941pp.

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, 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. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ.

Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Ward D 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977) (Diptera: Psychodiade), the major vector to man *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bull Ent 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, de 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 Ent Res* 87: 187-195.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LA, Silva AR 2000. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I – Riqueza e abundância relativa das espécies em áreas de colonização recente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33 (1): 11 – 19.
- Ryan L, Vexenet A, Marsdem PD, Lainson R 1990. The importance of rapid diagnoses of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sand fly vector. *Trans Roy 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 Entomol* 12:315-317.
- Shaw JJ 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 471-478.
- Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R, Braga RR, Silveira FT 1991. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, De Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira in Pará State, Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 66: 243 0- 246.
- Schlein Y, Jacobson RL 2002. Linkage between susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to *Leishmania major* and hunger tolerance. *Parasitology* 125(4): 343-348.
- Silva OS, Grunewald J 1999. Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 579-582.

- Silveira FT, Ishikawa EAY, Souza AAA, Lainson R 2002. Na outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. a new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. *Parasite* 9: 43-50.
- 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(3): 319-24.
- 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(6): 759-765.
- Taniguchi HH, Tolezano JE 1988. American cutaneous Leishmaniasis in São Paulo State. II Seasonal fluctuation of Phlebotominae sandflies species in São Roque Country. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (Supp. 1): 201.
- 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.
- 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.
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH 1993. Deforestation: effects on vector-borne disease.
- Wasserberg G, Yarom I, Warburg A 2003. Seasonal abundance patterns of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts. *Med Vet Entomol* 17(4): 452-456.

Young DC, Duncan NA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). *Mem An Entomol Institut* 54: 1-881.

## Objetivos

### Geral

- Ampliar os conhecimentos sobre *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.*, importante transmissor de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil.

### Específicos.

- Avaliar a competência vetorial de *L. (N.) whitmani s.l.* através da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp;
- Determinar a distribuição geográfica de *L. (N.) whitmani s.l.* em associação com os circuitos epidemiológicos de LTA;
- Avaliar a variabilidade e o grau de estruturação genética de algumas populações brasileiras de *L. (N.) whitmani s.l.*

## Capítulo 1

*Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e a eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Amazônia. Contribuição ao conhecimento dos flebotomíneos vetores do Estado do Acre

## Introdução

No Brasil, as leishmanioses são consideradas doenças emergentes em franca expansão territorial, em todas as regiões geográficas e fazendo parte da lista de doenças que compõem o Sistema de Informação de Notificação Compulsória (Rangel & Lainson 2003).

O Programa Nacional de Leishmanioses, da Secretaria de Vigilância em Saúde, associando a alta densidade de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e variáveis sócio-ambientais, descreve circuitos (pólos) de produção da doença.

Na Amazônia, um destes circuitos epidemiológicos com características rural/ocupacional está descrito no Estado do Acre e vem merecendo atenção especial, em consequência do registro expressivo da forma clínica mucosa (cerca de 12%). Segundo dados da Vigilância Epidemiológica (AC), o perfil epidemiológico da doença no Estado retrata, principalmente, pacientes do sexo masculino (72%) e acima de 10 anos de idade (89%). Neste contexto, destacam-se os Municípios de Rio Branco, Xapuri e Bujari com registros consideráveis de notificação de casos humanos nos dois últimos anos, embora a doença esteja ocorrendo em todos os municípios do estado. Recentemente, Tojal et al. (2003) isolaram e caracterizaram leishmânias dermatrópicas circulantes entre os pacientes de Rio Branco: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) lainsoni*.

O objetivo foi, através da pesquisa de infecção natural por *Leishmania* sp., identificar potenciais vetores de LTA no Estado do Acre, por existirem lacunas no conhecimento das cadeias epidemiológicas da doença no norte do Brasil, as quais envolvem parasitos e vetores diferenciados.

## **Materiais e Métodos**

Os flebotomíneos foram coletados na localidade de Espinhara, Município de Bujari, perto Rio Branco. As coletas foram realizadas de 22 de agosto a 04 de setembro de 2004 com armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia & Chamberlain 1962), instaladas a 1 e 15 metros do solo, de 18:00h às 6:00h.

No laboratório, os flebotomíneos (fêmeas) depois de anestesiados (submetidos a baixa temperatura) foram dissecados individualmente, em uma gota de PBS estéril, para destacar o tubo digestivo (para observação da presença de promastigotas e/ou paramastigotas) e os três últimos segmentos abdominais (para identificação da espécie de flebotomíneo com base na análise das espermatecas). Uma vez, constatada a positividade do espécime, este material foi aspirado com uma seringa contendo 0,1ml de PBS estéril.

Em seguida, foram feitos inóculos de 0,02ml no dorso das patas posteriores de dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), previamente anestesiados. Esses animais foram mantidos em laboratório por 40 a 45 dias, quando foram realizadas biópsias nos pontos de inóculos (derme), fígado e baço, sendo os fragmentos transferidos para tubos (04) com meio de cultura DIFCO (Heart infusion Agar dehydrated 40g, água bi-destilada 1000ml), objetivando o isolamento e massa parasitária (grande quantidade de parasito), para caracterização. O exame dos tubos de cultivo prosseguiu por 10 dias.

## Resultados

Foram dissecados um total de 247 espécimes, dos gêneros *Lutzomyia* (17) e *Brumptomyia*, (1) pertencentes às seguintes espécies:

|   |    |
|---|----|
| <i>Lutzomyia. nevesi</i>                    | 46 |
| <i>L. (Psychodopygus) davisii</i>           | 42 |
| <i>L. (Psychodopygus) carrerai carrerai</i> | 41 |
| <i>Lutzomyia (N.) whitmani s.l.</i>         | 34 |
| <i>L. (Lutzomyia) sherlocki</i>             | 8  |
| <i>L. (Nyssomyia) antunesi</i>              | 8  |
| <i>L. peresi</i>                            | 8  |
| <i>L. saulensis</i>                         | 7  |
| <i>L. (Evandromyia) infraspinosa</i>        | 7  |
| <i>L. (Nysomyia) richardwardi</i>           | 4  |
| <i>L. (Psathyromyia) shannoni</i>           | 4  |
| <i>L. (Trichophoromyia) auraensis</i>       | 2  |
| <i>L. (Nyssomyia) shawi</i>                 | 2  |
| <i>L. (Sciopemyia) sordellii</i>            | 1  |
| <i>L. baculus</i>                           | 1  |
| <i>L. (Nyssomyia) flaviscutellata</i>       | 1  |
| <i>L. (Nyssomyia) olmeca bicolor</i>        | 1  |
| <i>Brumptomyia</i> sp.                      | 30 |

Dentre os exemplares de *L. (N.) whitmani s.l.* dissecados, um se encontrava naturalmente infectado e sem resíduo de sangue no interior do duto intestinal. Albergava promastigotas livres no intestino médio e paramastigotas aderidos à parede do intestino posterior no piloro.

Não houve crescimento parasitário nos tubos com meio de cultura DIFCO, dos fragmentos retirados da biópsia dos hamsters.



Pela localização no interior do tubo digestivo do flebotomíneo, os parasitos pertenciam à Seção Peripilária, correspondendo assim a uma leishmânia do subgênero *Viannia*, segundo a classificação proposta por Lainson et al. (1977) e Lainson & Shaw (1987).

## **Discussão**

No Estado do Acre foram coletadas 37 espécies de flebotomíneos, sendo *L. (N.) antunesi*, *L. (N.) flaviscutellata*, *L. (N.) umbratilis*, *L. migonei*, *L. (N.) whitmani s.l.* e *L. (P.) h. hirsuta* (Viana-Martins & Silva 1964, Arias & Freitas 1982), consideradas transmissores potenciais de leishmaniose tegumentar. Recentemente, Aguiar & Medeiros (2003) relataram para o Estado do Acre cerca de 50 espécies de flebotomíneos sem, contudo registrar novos vetores de leishmaniose tegumentar (Fig. I).

Foram identificaram 36 espécies de flebotomíneos nos Municípios de Rio Branco e Xapuri (AC), com predominância dos subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus*. Das espécies registradas merecem atenção, por sua importância epidemiológica, *L. (N.) whitmani s.l.*, a de maior representatividade, *L. migonei* e *L. (N.) umbratilis*, em Rio Branco, e *L. (N.) flaviscutellata*, *L. (N.) ubiquitalis*, *L. (N.) whitmani s.l.*, *L. (N.) umbratilis* e *L. migonei*, em Xapuri (Azevedo et al. 2003).

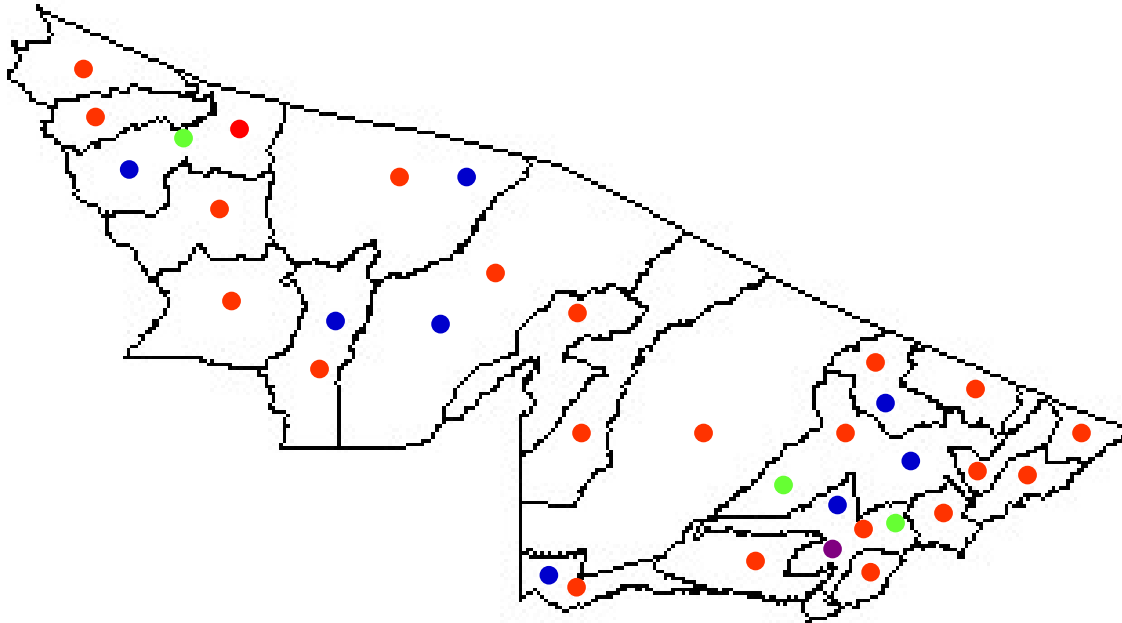
As leishmânias isoladas de lesões de pacientes do Estado do Acre e a identificação de potenciais flebotomíneos vetores, sugerem a existência de três ciclos de transmissão de leishmaniose tegumentar: *L. (N.) whitmani s.l.* - *L. (V.) braziliensis*, *L. (N.) ubiquitalis* - *L. (V.) lainsoni* e *L. (N.) umbratilis* - *L. (V.) guyanensis*, já registrados na literatura e que ocorrem em outras regiões do Brasil (Young & Duncan 1994, Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003).

O registro de infecção natural em *L. (N.) whitmani s.l.* por uma leishmânia do subgênero *Viannia* evidência a associação deste flebotomíneo com *L. (V.) braziliensis*, na região Amazônica. Arias et al. (1985) já haviam relatado o isolamento de duas cepas de *Leishmania* denominadas de *L. braziliensis-like*, a partir de dois exemplares de *L. (V.) braziliensis* coletados em Rio Branco embora não se conhecesse, naquela época, as leishmânias que circulavam entre os humanos. Outro aspecto importante que deve ser considerado é o elevado número de casos humanos com lesão de mucosa, no estado,

forma clínica que tem a *L. (V.) braziliensis* como único agente etiológico. Estudos recentes de Oliveira et al. (2005), utilizando análise por PCR, revelaram positividade em 97.1% para leishmânia do subgênero *Viannia* de pacientes portadores de comprometimento da mucosa nasal, oriundos de Rio Branco.

A ampla distribuição de *L. (N.) whitmani s.l.* em concordância com o registro de casos humanos de leishmaniose tegumentar (Figura 1) no Acre, além da ausência dos flebotomíneos *L. (P.) wellcomei* e *L. (P.) complexa*, incriminados como transmissores de *L. (V.) braziliensis* na Amazônia, reforçar a importância de *L. (N.) whitmani s.l.* na epidemiologia da LTA no estado.

## Estado do Acre



**Figura 1:** Mapa do Estado do Acre, com a distribuição de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.* por municípios com casos humanos de leishmaniose tegumentar americana (LTA). ● Municípios com casos de LTA (2004); prováveis transmissores: ● *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.* (infecção natural), ● *Lutzomyia umbratilis* e ● *Lutzomyia ubiquitalis*. (EF Rangel & ML Vilela – Banco de Dados do Programa Nacional de Leishmanioses).

## Referências Bibliográficas

- Aguiar GM, Medeiros WM 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel & Lainson eds., Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 207-256pp.
- Arias JR, Freitas RA 1982. The known geographical distribution of sand flies in the State of Acre, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica*, 12(2): 401-408.
- Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povia MM, de Freitas R.A.; Biancardi CB, Castellon EG 1985. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6): 1098-1108.
- Azevedo ACR, Afonso MMS, Vidal J, Vilela ML, Pinto MCG, Rangel EF 2003. Estudos sobre os flebotomíneos em áreas de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Acre, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: (Supl I): 435.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature (London)*, 266: 628-630.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. (ed. By W. Peters and R. Killick-Kendrick) Academic Press London. (1): 1-120pp.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New Leishmaniasis \_ The Neotropical *Leishmania* species. In. *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson's, 9<sup>th</sup> Edition, Chapter 13 p. 241-266.
- Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira, CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JM, Barral A 2005. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Tropical*, 94(1):55-9.

- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Rangel EF e Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fiocruz, pp 291-310.
- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News*, 22: 126-129.
- Tojal AC, Romero GAS, Cupolillo E 2003. A diversidade das espécies causadoras de leishmaniose cutânea em Rio Branco-Acre. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: (Supl I): 49.
- Viana-Martins A, da Silva JE 1964. Notes on phlebotomus the state of Acre, with a description of 2 new species (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 24:127-38
- Young DC, Duncan NA 1994. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia sandflies* in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of American Entomological Institute*, 54: 1-881.

## Capítulo 2

**A Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.**

**Distribuição espacial de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l.**

**(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

## Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), presente em todas as unidades federadas brasileiras, como consequência de processos contínuos de desmatamentos e queimadas, para exploração de madeira, instalação de garimpos, agronegócios, construções de barragens e hidrelétricas, apresenta padrão epidemiológico clássico e, também, padrão de surto epidêmico associado a estas atividades (Lainson 1988, Rangel 1995, Rangel & Lainson 2003). Além disso, ocorre o intenso processo migratório, com ocupação de encostas e aglomerados na periferia de centros urbanos, como um componente sócio-econômico das populações carentes na busca de melhor qualidade de vida (Rangel 1995, Rangel et al. 1990).

No Brasil, a LTA está associada a várias leishmânias dermatrópicas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, cuja transmissão é atribuída a algumas espécies de flebotomíneos, o que determina diferentes ciclos de transmissão no território nacional. Neste contexto, destaca-se a *Leishmania (V.) braziliensis*, em todas as unidades federadas, sendo transmitida por *Lutzomyia (P.) wellcomei*, *L. (N.) whitmani s.l.* e *L. (N.) intermedia* (Rangel 1995, Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003).

Diante da magnitude do problema, o Programa Nacional de Leishmanioses, da Secretaria de Vigilância em Saúde, vem analisando a LTA sob a ótica de circuitos de produção da doença, numa tentativa de analisar a espacialização da parasitose no Brasil. Segundo P. Sabroza (comunicação pessoal), um circuito espacial de produção de leishmaniose tegumentar é “uma região extensa, complexa e contínua, definida a partir da elevada concentração de casos em um período considerado, sendo constituída por diversos pólos, na maior parte das vezes se superpondo a mais de um município. Os circuitos são decorrentes de processos sócio-ambientais particulares e dinâmicos, podendo apresentar tendência à expansão ou retração, em função das características de seus determinantes”.

O Brasil, hoje, dentro deste contexto, possui vários circuitos de produção de LTA, distribuídos em todas as regiões geográficas.

Considerando a sua importância na epidemiologia da LTA, em virtude de ser incriminado como o vetor de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*, o objetivo do presente estudo é investigar a distribuição espacial de *L. (N.) whitmani s.l.* em associação com os circuitos de produção de LTA estabelecidos para o território brasileiro.

## **Materiais e Métodos**

Foram compilados dados de artigos científicos, capítulos de livros e informações disponibilizadas pelas Secretarias de Estado da Saúde (Forattini 1973, Martins et al. 1978, Arias & Freitas 1982, Vexenat et al. 1986, Azevedo & Rangel 1991, Passos et al. 1993, Teodoro et al. 1993; 1998; 2003, Gomes 1994, Queiroz et al. 1994, Galati et al. 1996, Sherlock et al. 1996, Domingos et al. 1998, Mayo et al. 1998, Rebêlo et al. 1999; 2001, Luz et al. 2000, Andrade Filho et al. 2001, Ferreira et al. 2001, Luz et al. 2001, Camargo-Neves et al. 2002, Souza et al. 2002, Rangel & Lainson 2003, Souza et al. 2003, Barata et al. 2004; Leonardo & Rebêlo 2004) para caracterizar Municípios com registros de *L. (N.) whitmani s.l.* nos estados brasileiros.

Essas informações foram usadas para se criar um banco de dados, onde foi gerado uma matriz com dados censitários e epidemiológicos. A matriz foi exportada para o programa MapInfo<sup>®</sup> que elabora os mapas temáticos considerando a divisão do mapa do Brasil por estados e municípios, a distribuição espacial de *L. (N.) whitmani s.l.* e os circuitos epidemiológicos, no caso, do período de 1999 a 2001.

Estes dados foram analisados pelo programa SIG (Sistema de Geoinformação), com a finalidade de espacializar os dados descritivos oriundos das fontes pesquisadas.

Utilizou-se, também, um mapa da vegetação do Brasil para verificar a associação entre os diferentes tipos de vegetação e a presença *L. (N.) whitmani s.l.*



## Resultados

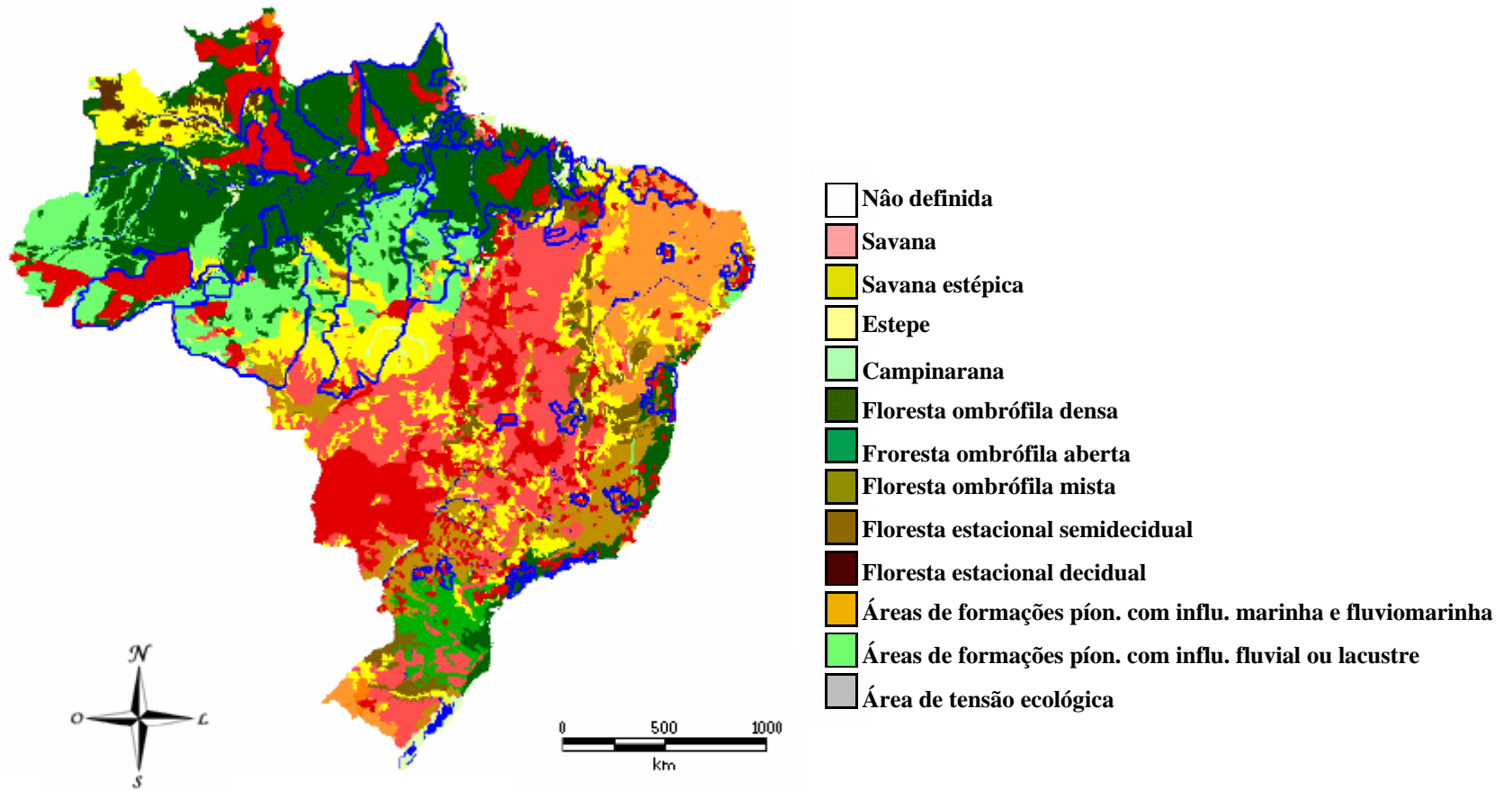
Foram gerados dois mapas que, por sobreposição, permitiram visualizar o registro de *L. (N.) whitmani s.l* em municípios associados aos diferentes tipos de vegetação e aos circuitos epidemiológicos de LTA.

*Espacialização.* *L. (N.) whitmani s.l.* foi registrada em 720 municípios brasileiros, dos 5561 pesquisados. *L. (N.) whitmani s.l.* foi verificada em vinte e seis unidades federadas, não ocorrendo, apenas em Santa Catarina.

Dentre todos os estados é importante mencionar que em Roraima, Acre, Tocantins e Mato Grosso do Sul verificam-se as maiores concentrações de municípios onde este flebotomíneo pode ser coletado. Por outro lado, Minas Gerais e São Paulo possuem áreas extensas onde a espécie não foi identificada.

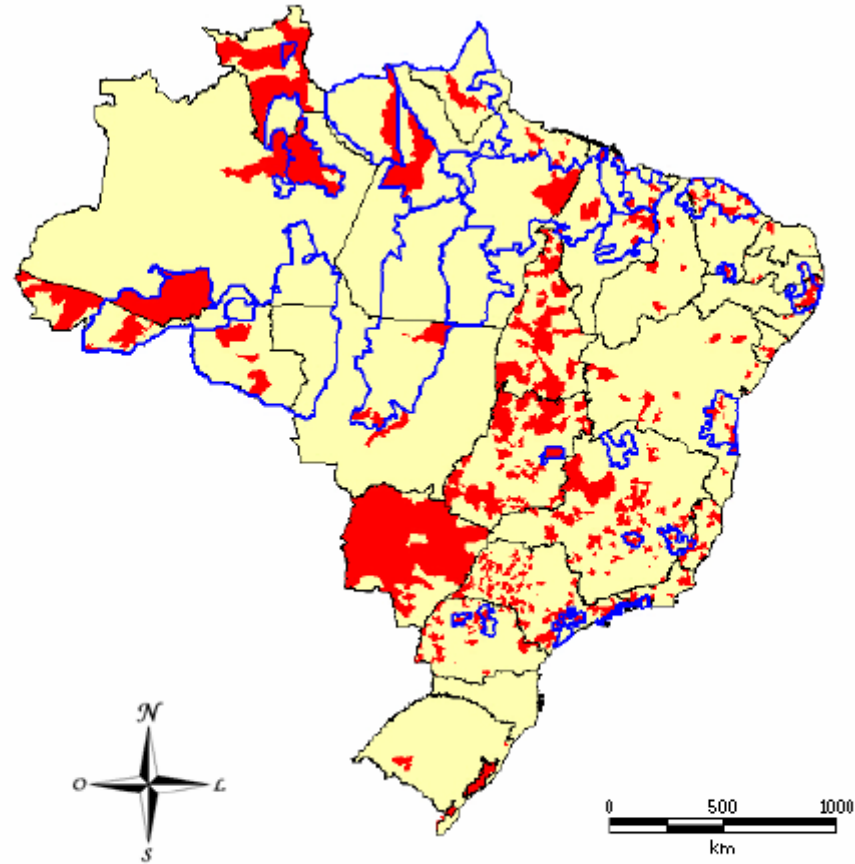
*Distribuição e vegetação.* Na análise da relação entre a cobertura vegetal e a ocorrência de *L. (N.) whitmani s.l.*, pode-se constatar sua presença nos diversos tipos de vegetação que incluem desde a Floresta Amazônica; Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Ombrófila Mista; campos cerrados (Região da Savana); caatingas nordestinas (Região da Savana Estépica) e a mata Atlântica (Florestas Tropicais) (Figura 1).

*Epidemiologia.* Sob a ótica dos circuitos epidemiológicos (= circuitos de produção) de LTA no Brasil, *L. (N.) whitmani s.l.* está presente na maioria deles, sugerido como transmissor de *L. (V.) braziliensis* (Figura 2). Esse flebotomíneo merece destaque na região Norte, especialmente nos circuitos associados aos Estados do Acre e Pará e também, em alguns circuitos do Nordeste, Sudeste e Sul, com distribuição no Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná.



**Figura 1: Tipos vegetação e a distribuição de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.* no Brasil.**

— Presença de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l.*



**Figura 2: Circuitos epidemiológicos de Leishmaniose Tegumentar Americana em associação com a presença de *Lutzomyia (N.) whitmani* s.l. no Brasil.** □ Ausência de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l.; ■ Presença de *L. (N.) whitmani* s.l.; □ Sem Informação sobre a presença de *L. (N.) whitmani* s.l. e ■ Circuito Epidemiológico de LTA.

## Discussão

Alguns trabalhos de revisão sobre os flebotomíneos transmissores das leishmanioses no Brasil, relatam a ampla distribuição geográfica de *L. (N.) whitmani s.l.*, listando, inclusive outros países do Continente Americano onde a espécie tem sido notificada, tais como Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Argentina (Martins et al. 1978, Young & Duncan 1994, Aguiar & Medeiros 2003, Rangel & Lainson 2003).

Obviamente, pelo relato desta investigação, por conta de sua distribuição geográfica em municípios de praticamente todos os estados brasileiros poder-se-ia supor que *L. (N.) whitmani s.l.* estaria associada com diferentes tipos de vegetação, tal como mostra o presente estudo e, conseqüentemente, adaptada a diferentes climas e habitats.

Desde os estudos de Barretto 1943, em São Paulo, já se podia obter as primeiras informações sobre a biologia de *L. (N.) whitmani s.l.* A espécie era considerada silvestre, podendo ser encontrada dentro das casas quando estas se localizavam no interior da mata ou em áreas vizinhas. Podia ser observada, no início da noite, no ambiente peridomiciliar picando o homem, os cães, ou ainda, ser coletada em grande número dentro dos galinheiros.

Nos relatos da Amazônia, o que se tem observado é que *L. (N.) whitmani s. l.* possui hábitos completamente diferentes do que se tem conhecimento em outras regiões estudadas. As primeiras informações sobre a espécie na Amazônia apontavam-na como silvestre, sendo coletada sobre o tronco e na copa das árvores de grande porte (Lainson et al. 1979). Estudos posteriores confirmaram essas informações, acrescentando que a espécie raramente invadia o domicílio, alimentava-se em animais silvestres e que, se praticasse antropofilia, só o fazia em condições especiais (Ready et al. 1986, Lainson 1988, Shaw et al. 1991).

As espécies de flebotomíneos podem ser encontradas em vários habitats, estando agrupadas em três categorias: silvestres, semidomésticas e domésticas. Neste contexto, foi constatada a associação de *L. (N.) whitmani s.l.*, com habitats que variam desde ambientes silvestres até o interior dos domicílios. Essa espécie poderia habitar troncos de árvores e raízes tabulares, ocos de árvores, copas de árvores, áreas marginais, anexos de animais domésticos do peridomicílio e intradomicílio (paredes internas e externas). *L.*

(*N.*) *whitmani s.l.* poderia ainda ser considerada em processo de domiciliação por sua adaptação à ambientes modificados pelo homem (Aguiar & Medeiros 2003).

As alterações drásticas do meio ambiente vêm alterando a ecologia de algumas espécies de leishmânias e, conseqüentemente, a epidemiologia das leishmanioses. O novo modelo epidemiológico das leishmanioses, foi afetado pelo desflorestamento, pois alguns mamíferos silvestres hospedeiros do parasito poderiam invadir áreas habitadas pelo homem, onde flebotomíneos em processo de domiciliação ou adaptados ao ambiente domiciliar e dotados de plasticidade alimentar, poderiam transmitir o parasito para humanos e outros mamíferos domésticos.

Diante das evidências acerca de *L. (N.) whitmani s.l.*, Lainson (1988) questiona o *status* taxonômico da espécie, em virtude da capacidade deste flebotomíneo habitar características ambientais tão variadas. Segundo este autor, talvez *L. (N.) whitmani s.l.* fosse um complexo de espécies.

Na contextualização epidemiológica, *L. (N.) whitmani s.l.*, na região Norte está atuando nos circuitos de produção de LTA, especialmente nos Estados do Amazonas e Pará, transmitindo *L. (V.) shawi*. No Amapá, sem circuitos definidos, este flebotomíneo é o responsável pela transmissão de *L. (V.) shawi*. No Acre, *L. (N.) whitmani s.l.*, até o momento, é a única espécie que reúne evidências para ser considerada como transmissora de *L. (V.) braziliensis*, sendo responsável pelo maior percentual de casos humanos, segundo a Secretaria de Estado da Saúde (Azevedo et al. 2005). Ainda que registrada em outros circuitos de ocorrência de LTA (Roraima e Rondônia) na Amazônia, seria prematuro afirmar seu papel na cadeia de transmissão, pois não se conhece o parasita circulando entre os humanos e pouco se sabe a respeito da sua competência vetorial.

O Estado de Tocantins, não reúne ainda condições para se definir circuitos de produção de LTA, mas a doença tem um grande impacto, pelo percentual de casos humanos com a forma mucosa (8,5%), e também, por estar em praticamente todos os municípios. A distribuição espacial de *L. (N.) whitmani s.l.* em concordância com os registros de casos humanos (Figura 3) o que o coloca como potencial transmissor (Vilela et al. 2005).

*Leishmania (V.) braziliensis* é a principal responsável pela LTA no Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil. Circuitos epidemiológicos importantes estão no

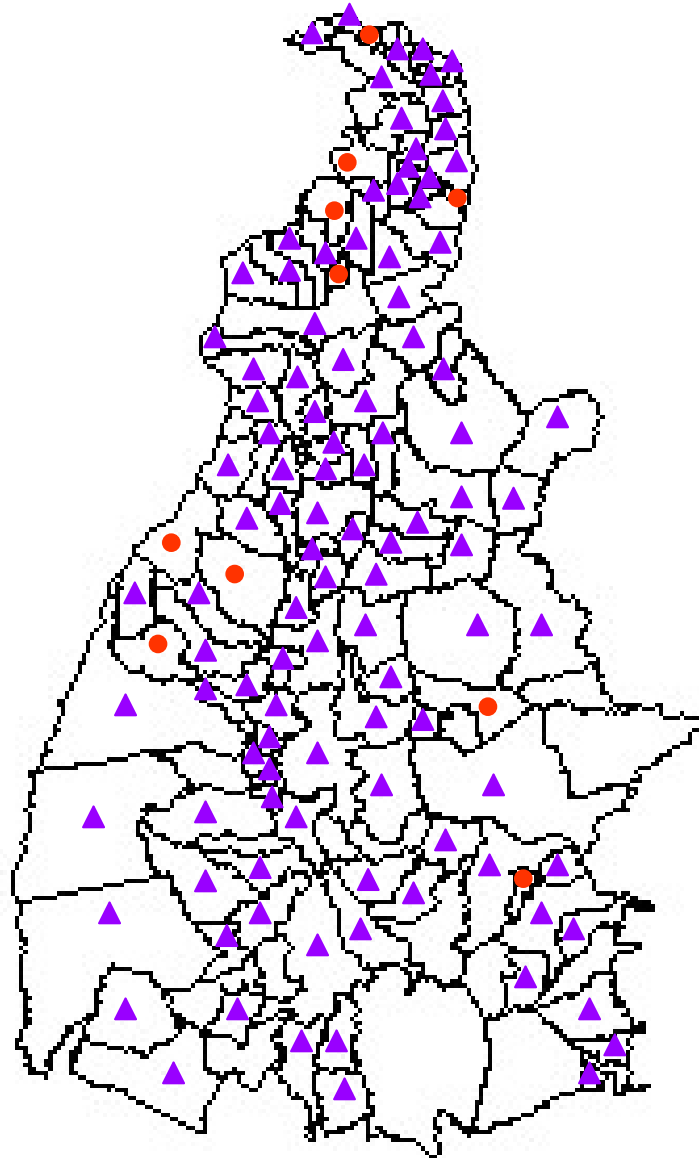
Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. Nestes estados, as populações de *L. (N.) whitmani s.l* já estão habitando ambientes domiciliares e reúnem dois importantes critérios considerados fundamentais na avaliação da competência vetorial de flebotomíneos que são: distribuição espacial em concordância com os casos humanos e antropofilia. Nos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, *L. (N.) whitmani s.l* é apontada como transmissora de *L. (V.) braziliensis*. Já nos Estados de Minas Gerais e Pernambuco, *L. (N.) whitmani s.l* não foi encontrada com infecção natural por promastigotas.

Independente de ser ou não um complexo de espécies crípticas é fato que *L. (N.) whitmani s.l* talvez se configure como o mais importante transmissor do agente etiológico da LTA no Brasil.

No Continente Americano, classicamente a LTA está associada à ambientes florestais, sendo considerada uma doença ocupacional (Lainson & Shaw 1987). Sob esta ótica, seria razoável admitir que a destruição das matas poderia reduzir consideravelmente a casuística da doença (Sampaio 1951).

O novo perfil epidemiológico resultante das drásticas alterações ambientais é em parte, devido à aproximação dos flebotomíneos vetores ao ambiente domiciliar. As cadeias de transmissão de LTA, onde *L. (N.) whitmani s.l* tem seu papel definido como vetor, são quadros que refletem esta realidade. Adicionalmente Peterson & Shaw (2003) trabalhando com modelagem de nichos ecológicos, demonstraram ser *L. (N.) whitmani s.l* capaz de suportar os efeitos de alterações climáticas globais e superar as mudanças ambientais para se adaptar a novos nichos ecológicos.

## Estado do Tocantins



**Figura 3.** Mapa do Estado de Tocantins, com a distribuição de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. por municípios. ● Municípios com casos de LTA (2003); ▲ municípios com casos de LTA e com presença de *Lutzomyia* (*N.*) *whitmani* s.l. (EF Rangel & ML Vilela – Banco de Dados do Programa Nacional de Leishmanioses).

## Referências Bibliográficas

- Aguiar GM, Medeiros WM 2003. distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF e Lainson R (eds)., *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fiocruz, pp 207-255.
- Andrade-Filho, JD, da Silva ACL, Falção AL 2001. Phlebotomine sand flies in the State of Piauí, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(8): 1085-1087.
- Arias J.R, Freitas RA 1982. The known geographical distribution of sand flies the State of Acre, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Acta Amazonica*, 12(2): 401-408.
- Azevedo ACR, Rangel EF 1991. Study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Baturité, Ceará, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(4): 405-410.
- Azevedo ACR, Lainson R, Afonso MMS, Rangel EF 2005. Estudio sobre *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbralitis* Ward & Frailha, 1977 (Psychodidae: Phlebotominae), vector de la Leishmaniasis Tegumentar Americana, en el Amazonas. *Salud y Ciencia*, Oct – Nov, 2005.
- Barata RA, da Silva JCF, da Costa RT, Fortes-Dias CL, da Silva JC, de Paula EV, Prata A, Monteiro EM, DIAS ES 2004. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5): 481-487.
- Barretto MP 1943. *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)*. São Paulo (Tese de Livre-Docência da Faculdade de Medicina da USP) 162pp.



- Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4): 1-11.
- Domingos MF, Carreri-Bruno GC, Claravolo RMC, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(5): 425-432.
- Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JBM, Falqueto A 2001. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of american cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(8): 1061-1067.
- Forattini OP 1973. *Entomologia Médica*, 4º Volume (Psychodidae, Phlebotominae) Leishmaniose e Bartonelose. Editora Edgard Blücher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo. 659pp.
- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval EC 1996. Study of the phlebotominae (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 30:115-128.
- Gomes AC 1994. Sand fly vectorial ecology in the state of São Paulo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3): 457-460.
- Lainson R 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philosophical Transactions of Royal Society B.*, 321: 389-404.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD 1979. Lesmmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 239-242.

- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. P. 1-20. In: W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds)., *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Academic Press, London.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson, 9<sup>th</sup> edition, chapter 13, p. 241-266.
- Leonardo FS, Rebêlo M 2004. *Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3):282-284.
- Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet A, Pandey A, Thomaz-Soccol V 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Annals of the Tropical Medicine and Parasitology*, 94(6): 623-631.
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A 2001. A urbanização das leishmanoses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(3):249-254.
- Martins AV, Williams P, Falcão AL 1978. *American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 195pp.
- Mayo RC, Casanova C, Mascarini LM, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA 1998. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(4):1-9.

- Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL, Katz N 1993. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1): 103-110.
- Peterson AT, Shaw J 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal Parasitology*, 33(9):919-31.
- Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FAC, Souza RM, David JR 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(6): 693-698.
- Rangel EF 1995. Tropical Diseases, Society and the Environment. SAREC Documentation/TDR,p.103-110.
- Rangel EF, Azevedo ACR, Aandrade CA, Souza NA, Wermelinger ED 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro, State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 39-45.
- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel & Lainson eds., Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 291-310pp.
- 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. *Bulletin of Entomological Research*, 76: 21-40.

- Rebêlo JM, de Oliveira ST, Silva FS, Barros VL, COSTA, J.M 2001. Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Amazonia of Maranhao. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Biology*, 61(1):107-15.
- Rebêlo JM, Leonardo FS, Costa JM, Pereira YN, Silva FS 1999. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from an endemic leishmaniasis area in the cerrado region of the State of Maranhao, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 15(3):623-30.
- Sampaio LF 1951. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Medicina*, 8: 717-721.
- Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R, Braga RR, Silveira FT 1991. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, De Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira in Pará State, Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Compparee*, 66: 243 0- 246.
- Sherlock IA, Maia H, Dias-Lima AG 1996. Preliminary results of a project about the ecology of Phlebotomus vectors of cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(2):207-214.
- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(6): 759-765.
- Souza MB, Cardoso PG, Sanavria A.; Marzochi MCA, de Carvalho RW, Ribeiro PC, Ponte CS, Meira AM, Meródio JC 2003. Fauna flebotomínica do município de Bom Jardim, Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(4): 150-153.

- 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. *Revista de Saúde Pública*, 27(3): 190-194.
- Teodoro U, Kühl JB, Rodríguez M, dos Santos ES, dos Santos DR, Maróstica LMF 1998. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, sul do Brasil. Estudo preliminar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(6):517-522.
- Teodoro U, 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 peridomiciliary area and building disinsectization on sandfly population density in the municipality of Doutor Camargo, Parana State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 19(6):1801-1813.
- Vexenat JA, Barretto AC, Rosa AC 1986. Infecção Experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81:125-126.
- Vilela ML, Grasser C, Azevedo ACR, Sena JM, Leite JH, Grajauskas AM.; Afonso MMSA, Novo SP, Gouveia C, Rangel EF 2005. Studies on the vectors of Leishmaniases in State of Tocantins, Brazil. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 82 (1): 126.
- Young DG, Duncan NA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54: 1-881.

### **Capítulo 3**

**Estudo da variabilidade genética entre populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitman s.l.* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) através da eletroforese de isoenzimas**

## Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença amplamente distribuída no território brasileiro e de transmissão focal, cuja dinâmica se diferencia nos locais em que ocorre em função da frequência de parasitos, vetores e ecossistemas.

*L. (N.) whitmani s.l.*, registrada na maioria dos estados brasileiros, é um flebotomíneo incriminado como transmissor de duas leishmânias dermatrópicas: *Leishmania (Viannia) shawi*, na Amazônia e *L. (V.) braziliensis*, nas Regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003). A bibliografia, relativa a estudos eco-epidemiológicos, relata comportamentos distintos desse vetor, em diferentes regiões do Brasil (Lainson 1988, Rangel et al. 1996, Ready et al. 1998, Rebêlo et al. 2000).

Diante desta evidência levanta-se a questão: *L. (N.) whitmani s.l.* é um complexo de espécies crípticas ou possui heterogeneidade inter ou intra-populacional associada à diferentes espécies de *Leishmania*? Para um melhor entendimento, deve-se levar em consideração o conhecimento mais apurado sobre os flebotomíneos vetores, especialmente a definição de sua posição taxonômica e aspectos sobre sua competência vetorial. Desta forma, o objetivo foi avaliar a variabilidade e o grau de estruturação genética de populações brasileiras de *L. (N.) whitmani s.l.* coletadas nos Estados da Bahia, Paraná e Pará, visando definir se existe grau de diferenciação entre elas que possa sugerir a existência de um complexo de espécies.

## Matérias e Métodos

*Procedência dos espécimes:* Os espécimes foram coletados nos Municípios de Ilhéus (Bahia) (localidade-tipo), Londrina (Paraná), Santarém e Paragominas (Pará) (Figura 1). Essas populações foram selecionadas por representarem diferentes regiões geográficas levando-se em conta seus hábitos e a associação com espécies de *Leishmania* (*Viannia*) spp.

### *Descrição das áreas amostradas:*

Ilhéus (BA): O Município de Ilhéus, com 1.712 km<sup>2</sup>, localiza-se nas coordenadas 14°47'S e 39°2'W. Possui um clima tropical quente e super úmido, com um elevado índice pluviométrico (1.500 a 2.000mm); temperatura média tem oscilado entre 19° e 28°C e umidade relativa anual de 87,3%. A vegetação apresenta-se densa, típica de floresta ombrófila densa, como expansão da mata Atlântica. Predomina a vegetação secundária, com atividades agrícolas.

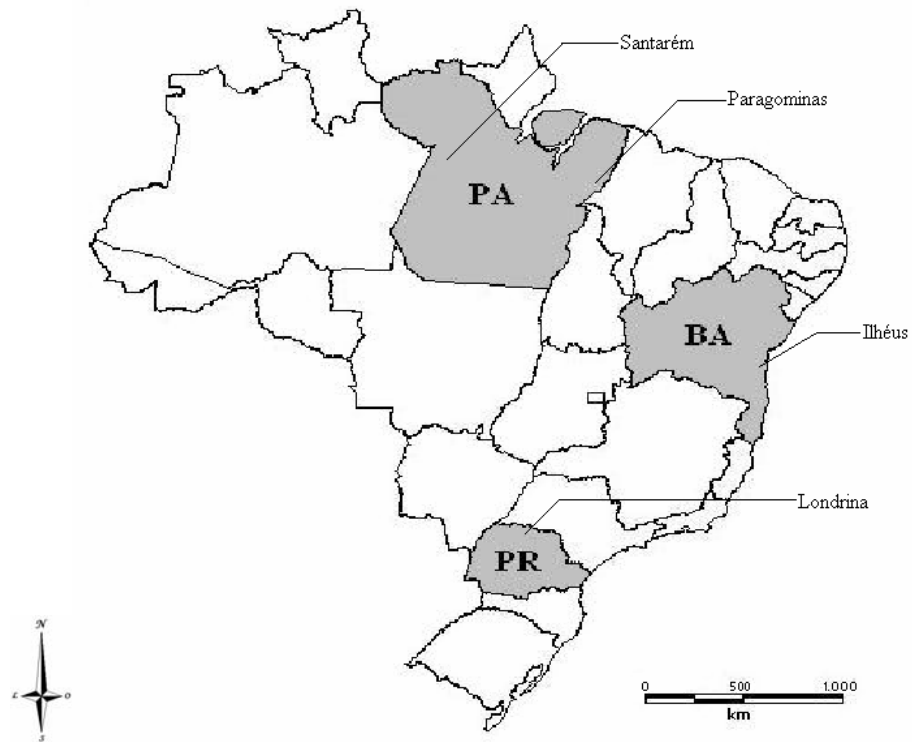
Londrina (PR): O Município de Londrina, com 1.724 km<sup>2</sup>, localiza-se nas coordenadas 23°17'S e 50°04'W. Possui um clima subtropical úmido mesotérmico, verões quentes com tendência de concentração das chuvas (temperatura média superior a 22°C), invernos com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), sem estação seca definida. O índice de pluviosidade anual é de 1.686 mm. A vegetação local é composta por floresta ombrofila densa.

Santarém (PA): O Município de Santarém, com 566 km<sup>2</sup>, localiza-se nas coordenadas 2°24'S e 54°42'W. Possui um clima quente e úmido com temperatura média anual em torno de 25°C e 27°C. As temperaturas mais elevadas ocorrem entre os meses de junho a novembro e o período de maior precipitação pluviométrica é de dezembro a maio, (1.920mm ao ano). A vegetação local é composta por floresta ombrófila densa (floresta tropical fluvial).



Paragominas (PA): O Município de Paragominas localiza-se no nordeste do Estado do Pará, entre as coordenadas 2°57'S e 47°31'W. O município é drenado por duas bacias, a do rio Capim e a do rio Gurupi. O clima é quente e úmido, com 1.700mm/ano de precipitação com pouca chuva, de junho a dezembro. As florestas da região são perenifólias.

*Coletas:* Os flebotomíneos foram coletados no peridomicílio (Ilhéus e Londrina) e na mata (Paragominas e Santarém), com armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia & Chamberlain 1962) e/ou armadilha de Shannon (Shannon 1926) e acondicionados em tubos Eppendorf e, criopreservados em nitrogênio líquido. A identificação de *L. (N.) whitmani s.l.*, foi realizada colocando-se os espécimes criopreservados em uma placa fria (criolizador) dentro de um recipiente isotérmico com volume de oito litros, contendo gelo seco; os três últimos segmentos abdominais foram dissecados e as genitálias colocadas em uma gota de potassa a 10%, entre lâmina e lamínula, e levadas ao microscópio para a análise das estruturas morfológicas e confirmação da espécie.



**Figura 1. Locais de coletas das populações estudadas de *Lutzomyia (Nyssomya) whitmani* s.l. das diferentes regiões do Brasil.**

### *Análise isoenzimática*

*Preparo das Amostras:* os exemplares identificados, foram retirados do nitrogênio líquido, macerados individualmente em 12 µl de tampão de lise (10ml Tris HCl pH8,0, 10ml Triton X-100 a 10%, 37mg EDTA, 15mg DTT, 13mg ácido ε-Amino-N-capróico e 80ml de água) e mantidos resfriados no gelo.

*Eletroforese em gel de agarose:* A técnica de eletroforese em gel de agarose (Hjärten 1961) foi utilizada considerando-se as modificações de Salles et al. (1986).

O gel de agarose foi preparado a partir de uma solução de 1% de agarose (SIGMA), em 1:1 solução tampão e água destilada, derramada ainda quente num filme de poliéster (marca FMC, modelo 124 X 258 mm GELBOND), sobre uma placa nivelada e, após solidificação, guardado no refrigerador por 24 horas. Ao ser retirada do refrigerador, uma película plástica, com 24 pequenos orifícios retangulares equidistantes e numerados (fita de aplicação), foi colocada em sua superfície paralelamente ao lado de maior comprimento.

Cerca de 3 µl do homogenado de cada flebotômico foram aplicados em cada orifício da fita de aplicação. Uma solução indicadora (34 mg de azul de bromofenol, 28 mg de xilenocianol e 10 ml de água destilada) foi aplicada com algumas amostras para verificar o “front” de migração da corrida eletroforética e determinar se a mesma ocorreu uniformemente. A corrida eletroforética foi realizada a uma potência média de 40W (175V e 229 mAmp).

Após a eletroforese, as enzimas foram reveladas, a 37°C, em estufa incubadora (Fanem) por cerca de 30 minutos e a reação foi interrompida com a adição de uma solução de ácido acético a 5%, que foi trocada algumas vezes a fim de se retirarem os corantes não precipitados. Em seguida, o gel foi posto para secar à temperatura ambiente para fotografia e análise.

*Sistemas Enzimáticos Analisados:* Foram testados 15 sistemas enzimáticos (Tabela I) em diferentes tampões, sistemas de revelação e meios de suportes.

O alelo mais rápido de um determinado loco enzimático em todas as populações foi denominado de “a”, o segundo mais rápido de “b” e assim por diante.

A interpretação das bandas ocorreu de acordo com os padrões para enzimas mono, di e tetraméricas (Shaw & Prasad 1970, Harris & Hopkinson 1978, Richardson et al. 1986). As frequências genótípicas observadas foram obtidas através da contagem direta, a partir dos padrões nos géis.

*Análise dos dados:* O programa BIOSYS (Swofford & Selander 1981) foi utilizado para os seguintes procedimentos:

- cálculo das frequências gênicas para cada loco da população amostrada;
- análise da variabilidade genética, através dos cálculos do número médio de alelos por loco (A), percentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) para cada loco;
- testes de ajuste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências genótípicas de cada população e da população total.
- cálculo dos índices de variação interpopulacional e da distância genética entre cada par de populações (Nei 1978) e construção do dendograma pelo método UPGMA (Sokal & Sneath 1963).
- estudo da estruturação populacional através do cálculo dos índices de fixação de Wright (estatística  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ ) (Wright 1965, Nei 1977, Wright 1978), segundo a redefinição de Nei (1978). Os níveis de significância de  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  foram calculados usando o teste de qui-quadrado (Waples 1987).

## **Resultados**

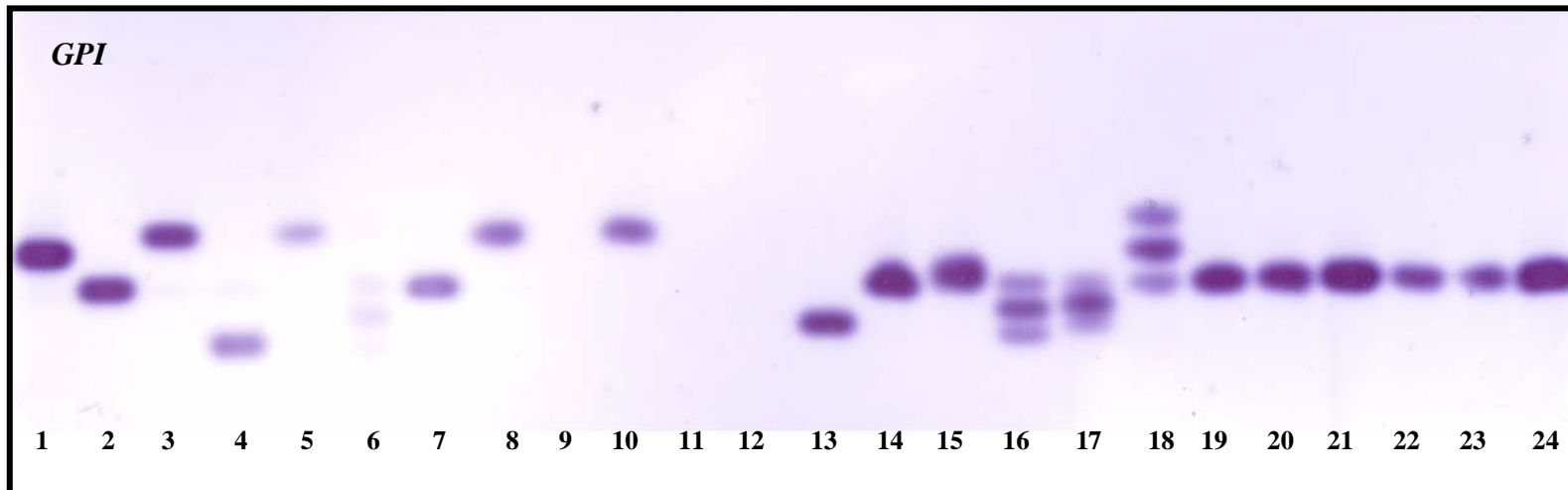
Dos 15 sistemas enzimáticos testados, cinco (GPI, MDH, PGM, ME e PGD), apresentaram atividade e resolução que permitiram uma interpretação segura e a identificação de cinco locos gênicos.

As frequências alélicas dos cinco locos, analisados para as quatro populações (Paragominas, Santarém, Londrina e Ilhéus) (Tabela II). Nenhum dos cinco locos analisados foi diagnóstico entre as populações. Foram estabelecidos padrões eletroforéticos para os sistemas glicose fosfato isomerase (GPI) e desidrogenase do malato (MDH) respectivamente, nas quatro populações analisadas (Figuras 2 e 3).

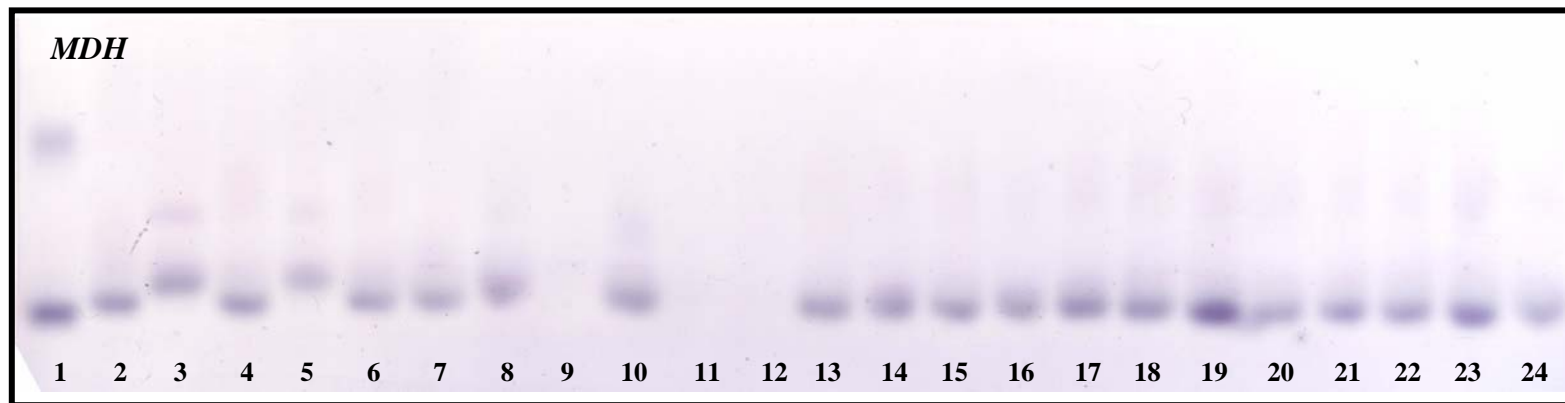
O número médio de indivíduos analisados (N), de alelos por loco (A) e a porcentagem de loco polimórficos (P) encontram-se na Tabela III. Esta evidencia, também, que a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) nas quatro populações variou de  $0,087 \pm 0,080$  e  $0,138 \pm 0,98$  enquanto a esperada ( $H_e$ ) variou de  $0,254 \pm 0,121$  e  $0,317 \pm 0,144$ . Todas as populações estudadas estão em conformidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ).

Os valores de similaridade genética entre as quatro populações analisadas variaram de 0.939 a 0.994 e os de distância genética variaram de 0,006 a 0,063 (Tabela IV). O menor valor de distância genética ( $D = 0,006$ ) foi observado entre populações de Ilhéus e Santarém. Embora Paragominas e Santarém pertençam o mesmo estado, observou-se uma distância genética de 0.030 entre estas localidades. Os valores de distância genética foram maiores entre as populações de Paragominas com a de Londrina ( $D = 0.063$ ) e de Ilhéus ( $D = 0,045$ ) (Tabela IV). A população de Paragominas constitui um ramo isolado, separado das demais populações, que apresentaram menor distância genética entre si e formaram, conseqüentemente, um único grupo (Figura 4).

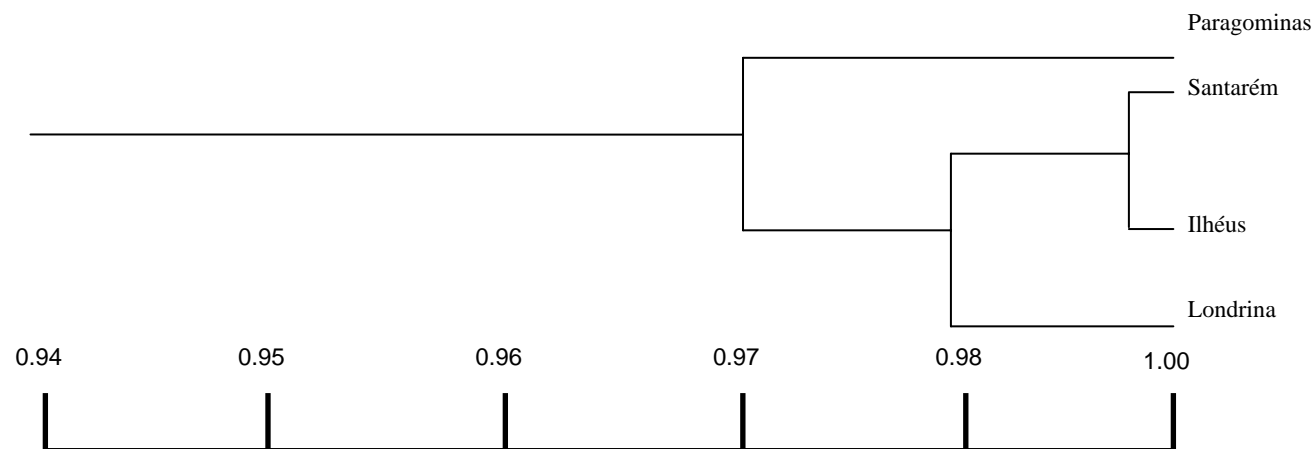
A análise de estruturação gênica das populações demonstrou valor médio de  $F_{IS}$  maior que o valor de  $F_{ST} = (0,493 > 0,046)$ , sugerindo uma certa diferenciação intrapopulacional (Tabela V). O número de migrantes por geração entre as diferentes localidades ( $Nm = 5.1$ ), indica a existência de fluxo gênico entre as populações analisadas.



**Figura 2. Padrão eletroforético para o sistema glicose fosfato isomerase (GPI). Populações analisadas: do 1 ao 6 Santarém, do 7 ao 12 Paragominas, do 13 ao 18 Londrina e do 19 ao 24 Ilhéus.**



**Figura 3. Padrão eletroforético para o sistema desidrogenase do malato (MDH). Populações analisadas: do 1 ao 6 Santarém, do 7 ao 12 Paragominas, do 13 ao 18 Londrina e do 19 ao 24 Ilhéus.**



**Figura 4. Dendrograma construído pelo método de UPGMA, baseado nos valores de distância genética (Nei, 1978), entre as quatro populações de *Lutzomyia (N.) whitmani s.l.* analisadas.**



## Discussão

A eletroforese de isoenzimas têm sido, freqüentemente, utilizada em estudos de variabilidade genética inter ou intrapopulacional em populações naturais de flebotomíneos (Lanzaro et al. 1993, Mukhopadhyay et al. 1997, 1998, Mutebi et al. 1998, Arrivellaga et al. 2000, 2003, Azevedo et al. 2000).

Os resultados revelaram alta proporção de locos polimórficos ( $P = 60\%$ ) nas populações estudadas, apesar de apenas, cinco sistemas enzimáticos terem sido analisados. Valores semelhantes já foram encontrados por Azevedo et al. (2000) ao analisar 5 populações de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* ( $P = 50\%$ ) e por Meneses et al. (2005) ao analisar 3 populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* ( $P = 50\%$ ).

A heterozigosidade média observada, variou de 0,087 a 0,138, nas populações de *L. (N.) whitmani s.l.* analisadas no presente trabalho estão de acordo com aqueles já verificados para outras espécies de *Lutzomyia*. Mukhopadhyay et al. (1997), por exemplo, verificaram que o valor da heterozigosidade observada em populações naturais de *L. longipalpis* coletadas na Gruta da Lapinha (Lagoa Santa) foi de 0,150. Valor semelhante ( $H = 0,161$ ) foi verificado por Azevedo (2000), ao estudar 5 populações de *L. longipalpis*, inclusive a da Gruta da Lapinha (Lagoa Santa).

Por outro lado Lanzaro et al. (1993), analisando três populações de *L. longipalpis* mantidas em laboratório, observaram que os valores da heterozigosidade variou entre 0,057 a 0,071; valores bem menores do que os obtidos no presente trabalho. Munstermann (1994) entretanto, chamou a atenção para o fato de que a principal conseqüência na utilização de populações mantidas em laboratório é que estas geralmente apresentam um decréscimo na heterozigosidade. Esta diminuição na heterozigosidade pode ocorrer devido a fatores como endocruzamento, efeito fundador ou efeito gargalo de garrafa. Uma outra conseqüência da manutenção de colônia em laboratórios é a possibilidade de ocorrer (através da deriva gênica ou seleção direcional) a fixação aleatória de alelos de freqüência moderada ou mesmo raros. Com isso, locos que antes não

eram diagnóstico entre as populações podem passar a ser. Isto pode ter ocorrido no estudo efetuado por Lanzaro et al. (1993). Estes autores analisaram populações de *L. longipalpis*, mantidas em laboratório, no Brasil, Colômbia e Costa Rica e encontraram diversos locos diagnósticos, o que os levou a considerar a possibilidade de estarem trabalhando com um complexo de espécies.

A análise de estruturação gênica das populações revelou um excesso de homozigotos e sugeriu uma baixa diferenciação genética intrapopulacional. De acordo com Eanes & Koehn (1978) a estrutura genética populacional é consequência dos padrões de acasalamento e da magnitude de fluxo gênico entre as populações. Estes autores consideram que altas taxas de fluxo gênico entre as populações e a tendência a acasalamentos intrapopulacionais casuais podem levar a diminuição da estrutura genética. Isto poderia estar ocorrendo nas populações analisadas, uma vez que a taxa de fluxo gênico pode ser considerada alta ( $Nm=5,1$ ) e, os valores de  $F_{is}$  foram maiores do que os valores de  $F_{st}$ , o que pode indicar a ocorrência de acasalamento não-casuais nas populações e, conseqüentemente, ao aumento do número de indivíduos homozigotos.

As distâncias genéticas entre as populações analisadas foram baixas, indicando que as mesmas são geneticamente similares. Estes dados são similares àqueles verificados em populações de várias espécies de insetos. Van Driel et al. (1987), por exemplo, encontraram valores de distância genética variando entre 0,001 e 0,016 em *Anopheles stephensi* do Paquistão. Santos et al. (1999) analisaram quatro populações naturais de *Anopheles darlingi*, encontrando valores de distância genética que variaram de 0,010 a 0,024. Azevedo et al. (2000) observaram em populações de *L. longipalpis* uma distância genética variando entre 0,004 e 0,037, enquanto a distância entre quatro populações de *Aedes aegypti* de Manaus variou de 0,003 a 0,016 (Fraga et al. 2003).

Apesar dos baixos valores de distância genética estimada para os diferentes pares de populações amostradas, foi possível verificar, uma maior diferenciação entre a população de Paragominas e as demais populações analisadas, o que contribui para que a mesma formasse uma ramo isolado na análise de agrupamento. Várias diferenças morfométricas entre esta população e

as populações de *L. (N.) whitmani s.l.* do Nordeste brasileiro foram observadas, por Rangel et al. (1996) A população do Pará pode ser separada daquelas do Nordeste pelo comprimento do labro das fêmeas, tamanho dos 2° e 3° segmentos palpais dos machos, raio da asa (R5) e largura máxima da asa dos machos, comprimento da tíbia e do fêmur de ambos os sexos, comprimento dos filamentos genitais dos machos e relação filamento genitais/bomba genital. Análises com DNA recombinante, também, serviram para demonstrar diferenças entre as populações analisadas (Rangel et al. 1996). Neste caso, a sonda W1 (específica para *L. (N.) whitmani s.l.* do Pará) evidenciou fortes sinais de hibridação, apenas, entre as duas populações do Pará (Dom Eliseu e Paragominas).

Os resultados obtidos sugerem que as populações de *L. (N.) whitmani s.l.* representem uma única espécie. Entretanto, a discussão que se levanta sobre *L. (N.) whitmani s.l.* representar ou não um complexo de espécies está baseada em aspectos da sua biologia e da competência vetorial, que revelam sua capacidade em transmitir duas leishmânias distintas e ter hábitos diferenciados com ocupação de ecótopos variados. A literatura demonstra que um fator essencial para a instalação da infecção por leishmânias em flebotomíneos é sua capacidade de adesão das promastigotas ao epitélio intestinal dos flebotomíneos, após escape da matriz peritrófica. Uma molécula presente na superfície das promastigotas, a lipofosfoglicana (LPG), não só permite, como controla este mecanismo de adesão (Pimenta et al. 1989, 1991). Esta função da LPG acontece por meio de unidades sacarídeas que se ligam especificamente as microvilosidades das células epiteliais no intestino dos flebotomíneos, ou seja, existem diferentes LPG para as diferentes espécies de leishmânias. Estas LPGs estão associadas à receptores específicos nos flebotomíneos, sugerindo uma adaptação evolutiva entre parasitos e seus vetores na natureza (Pimenta et al. 1992, Sacks et al., 1995).

A LPG é constituída por um núcleo glicana e uma âncora lipídica, altamente, conservados e as unidades sacarídicas são responsáveis pelo polimorfismo na molécula, então como explicar um mesmo flebotomíneo transmitindo duas diferentes espécies de leishmânia? A capacidade de adesão do parasita ao epitélio do tubo digestivo do flebotomíneo vetor está relacionada ao

polimorfismo da LPG, por isto, poder-se-ia sugerir que existem unidades sacarídicas semelhantes em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*, que poderia aderir à um mesmo sítio receptor no intestino de *L. (N.) whitmani s.l.*, o que poderia parecer improvável. A possibilidade de que *L. (N.) whitmani s.l.* pertença a uma única espécie, mostraria sua capacidade de se adaptar ao meio ambiente drasticamente alterado assumindo hábitos de uma espécie que caminharia para um processo de domiciliação. Isto ocorreria pelo fato de que, uma espécie mostra dois padrões de comportamento: na Amazônia, silvestre, não invadindo domicílios e com pouca tendência para picar humanos e, no resto do território brasileiro, é freqüentemente, encontrada no ambiente peridomiciliar, chegando mesmo a invadir domicílios, além de picar humanos e animais domésticos.

Nesta linha de pensamento, Ready et al. (1998) sugeriram estar havendo fluxo gênico entre populações extra-amazônicas e, Ishikawa et al. (1999) discutem a idéia de que, ainda existe, ou existiu num passado muito recente, um processo contínuo de cruzamento entre populações de *L. (N.) whitmani s.l.*, a partir da Amazônia.

Pode-se pensar num contínuo fluxo gênico entre populações da Amazônia e de outras regiões, resultando na seleção de gens que controlaria um comportamento adaptativo, pelo contato mais estreito e freqüente do vetor com os humanos. Um exemplo recente deste fluxo genético poderia estar ocorrendo num gradiente ecológico entre a floresta Amazônia e os cerrados, em função do intenso desmatamento e resultando na seleção de um comportamento pouco freqüente, que permite o encontro de *L. (N.) whitmani s.l.* próximo ao ambiente periurbano, determinando a expansão da LTA no Estado do Maranhão (Leonardo & Rebêlo 2004).

Os resultados apresentados, talvez, sejam insuficientes para uma conclusão definitiva sobre a hipótese de que *L. (N.) whitmani s.l.* seja um complexo de espécies, devido a magnitude da dispersão deste flebotomíneo. Isto mostrou a necessidade da continuidade dessa linha de investigação, estendendo os estudos à outras populações, e aprofundando os conhecimentos sobre seus hábitos alimentares.

**Tabela I. Nome, sigla, número da Comissão de Enzimas e estrutura quaternária dos sistemas enzimáticos testados.**

| Enzima                            | Sigla         | Número da Comissão<br>Enzima (EC) | Estrutura<br>Quaternária |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Aconitase                         | ACON          | 4.2.1.3                           | monomérica               |
| Enzima málica                     | ME            | 1.1.1.4.0                         | tetramérica              |
| Fosfogliconato desidrogenase      | PGD           | 1.1.4.4                           | dimérica                 |
| Glicose fosfato isomerase         | GPI           | 5.3.1.9                           | dimérica                 |
| Fosfoglicomutase                  | PGM           | 2.7.5.1                           | monomérica               |
| Alfa-glicerofosfato desidrogenase | $\alpha$ -GPD | 1.1.1.8                           | tetramérica              |
| Glicose-6-fosfato desidrogenase   | G6PDH         | 1.1.1.4.9                         | dimérica                 |
| Glutamatoxaloacetato transaminase | GOT           | 2.6.1.1                           | dimérica                 |
| Hexoquinase                       | HK            | 2.7.1.1                           | monomérica               |
| Isocitrato desidrogenase          | IDH           | 1.1.1.4.2                         | dimérica                 |
| Leucina amino-peptidase           | LAP           | 3.4.1.1                           | monomérica               |
| Desidrogenase do malato           | MDH           | 1.1.1.3.7                         | dimérica                 |
| Manose fosfato isomerase          | MPI           | 5.3.1.8                           | monomérica               |
| Peptidase                         | PEP           | 3.4.1.1                           | dimérica                 |
| Fumarase                          | FUM           | 4.2.1.2                           | tetramérica              |

**Tabela II. Frequências alélicas dos cinco locos estudados nas populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. amostradas.**

| Loco       | Populações  |          |          |        |
|------------|-------------|----------|----------|--------|
|            | Paragominas | Santarém | Londrina | Ilhéus |
| <i>Gp</i>  |             |          |          |        |
| (N)        | 26          | 31       | 47       | 37     |
|            | 0.960       | 0.161    | 0.181    | 0.014  |
| A          | 0.442       | 0.645    | 0.691    | 0.851  |
| B          | 0.269       | 0.194    | 0.128    | 0.135  |
| C          | 0.192       | 0.000    | 0.000    | 0.000  |
| D          |             |          |          |        |
| <i>Mdh</i> |             |          |          |        |
| (N)        | 11          | 26       | 24       | 34     |
|            | 0.182       | 0.154    | 0.333    | 0.235  |
| A          | 0.818       | 0.846    | 0.667    | 0.765  |
| B          |             |          |          |        |
| <i>Pgm</i> |             |          |          |        |
| (N)        | 8           | 11       | 24       | 27     |
|            | 0.563       | 0.182    | 0.063    | 0.222  |
| A          | 0.375       | 0.636    | 0.521    | 0.500  |
| B          | 0.063       | 0.182    | 0.250    | 0.259  |
| C          | 0.000       | 0.000    | 0.167    | 0.019  |
| D          |             |          |          |        |
| <i>Me</i>  |             |          |          |        |
| (N)        | 9           | 15       | 34       | 29     |
|            | 1.000       | 1.000    | 1.000    | 1.000  |
| A          |             |          |          |        |
| <i>Pgd</i> |             |          |          |        |
| (N)        | 20          | 20       | 29       | 35     |
|            | 1.000       | 1.000    | 1.000    | 1.000  |
| A          |             |          |          |        |

N= Número de espécimens analisados

**Tabela III. Estimativas das médias de variabilidade genética nas quatro populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. analisadas.**

| Populações  | Média de amostras por loco (N) | Média de alelos por loco (A) | Percentual de locos polimórficos* (P) | Heterozigosidade média |                  |
|-------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------|
|             |                                |                              |                                       | Ho                     | He               |
| Paragominas | 14.8 (3.5)                     | 2.2 (0.6)                    | 60                                    | 0.138<br>(0.98)        | 0.317<br>(0.144) |
| Santarém    | 20.6 (3.6)                     | 2.0 (0.4)                    | 60                                    | 0.093<br>(0.058)       | 0.270<br>(0.121) |
| Londrina    | 31.6 (4.3)                     | 2.2 (0.6)                    | 60                                    | 0.105<br>(0.067)       | 0.316<br>(0.133) |
| Ilhéus      | 32.4 (1.2)                     | 2.2 (0.6)                    | 60                                    | 0.087<br>(0.080)       | 0.254<br>(0.121) |

Um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum é menor que 90%.  
Obs: desvio padrão entre parêntesis.

**Tabela IV. Matriz de similaridade genética versus coeficiente de distância genética entre as quatro populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. amostradas.**

| Populações  | Paragominas | Santarém | Londrina | Ilhéus |
|-------------|-------------|----------|----------|--------|
| Paragominas | *****       | 0.970    | 0.939    | 0.956  |
| Santarém    | 0.030       | *****    | 0.991    | 0.994  |
| Londrina    | 0.063       | 0.009    | *****    | 0.991  |
| Ilhéus      | 0.045       | 0.006    | 0.009    | *****  |

**Tabela V. Índice de fixação dos três locos polimórficos nas quatro populações de *Lutzomyia (N.) whitmani s.l.* amostradas.**

| Locos        | F <sub>IS</sub> | F <sub>ST</sub> |
|--------------|-----------------|-----------------|
| <i>Gpi</i>   | 0.545           | 0.028           |
| <i>Mdh</i>   | 0.528           | 0.027           |
| <i>Pgm</i>   | 0.406           | 0.085           |
| <b>Média</b> | <b>0.493</b>    | <b>0.046</b>    |



## Referências Bibliográficas

- Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa-Freitas MG, Rangel EF 2000. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3):305-22.
- Arrivellaga JC, Rangel EF, Oviedo M Feliciangeli MD 2000. Correlated morphologic and genetic diversity among *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) collections in Venezuela. *Journal of American Mosquito Control Association*, 16: 171-174.
- Arrivellaga JC, Mutebi JP, Pinango H.; Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, Lanzaro GC 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Medical Entomology*, 40: 615-627.
- Eanes WF, Koehn RK 1978. An analysis of genetic structure in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *L'Évolution Psychiatrique* 32: 784-797.
- Fraga EC, Santos JMM, Maia JF 2003. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 26(2): 181-187.
- Harris H, Hopkinson DA 1978. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland. Amsterdam.
- Hjerten S 1961. Agarose as and anticonventional agent in zone electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 53: 514-517.
- Ishikawa EAY, Ready PD, Souza AA, Day JC, Rangel EF, Davies CR.; Shaw JJ 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazonia and Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(3): 339-345.

- Lainson R 1988. Ecological interations in the transmission of the leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B*, 321: 389-404.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New Leishmaniasis \_ The Neotropical *Leishmania* species. In. *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson's, 9<sup>th</sup> Edition, Chapter 13 p. 241-266.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 48: 839-847.
- Leonardo FS, Rebêlo M 2004. *Lutzomyia whitmani* periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3):282-284.
- Munstermann LE 1994. Unexpected Genetic Consequences of Colonization and Inbreeding: Allozyme tracking in Culicidae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 156-163.
- Mutebi JP 1998. Genetic Variability among populations of the Sand Fly, *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Central America. *Journal of Medical Entomology*, 35(2):169-74.
- Mukhopadhyay J, Rangel EF, Ghosh K, Munstermann LE 1997. Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its consequences. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 57: 216-221.
- Mukhopadhyay J, Ghosh, K, Azevedo ACR, Rangel EF, Munstermann LE 1998. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of American Mosquito Control Association*, 14: 277-282.

- Nei M 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41: 225-233.
- Nei M 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Pimenta PF, da Silva RP, Sacks DL, da Silva PP 1989. Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture-flip. A surface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. *European Journal of Cell Biology*, 48(2):180-90
- Pimenta, PFP Saraiva EM, Sacks DL 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugative expression of three fine stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, 72: 191-197.
- Pimenta PF, Turco SJ, Mc Conville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 26; 256(5065):1812-5.
- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel & Lainson eds., Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 291-310pp.
- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 43-50.
- Ready PD, de 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. *Bulletin of Entomological Research*, 87: 187-195.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LA, Silva AR 2000. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I – Riqueza e abundância relativa das espécies em áreas de colonização recente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (1): 11 – 19.

- Richardson BJ, Baverstock PR, Adams M 1986. Allozyme electrophoresis. Academic Press, Sydney, 408pp.
- Sacks DL, Pimenta PF, Mc Conville MJ, Schneider P, Turco SJ 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, 181(2):685-97.
- Santos JMM, Lobo JA, Tadei WP, Contel EPB 1999. Intrapopulation genetic differentiation in *Anopheles* (N.) *darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon region. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3): 325-331.
- Salles CA, Silva AR, Momem H 1986. Enzyme typing and phenetic relationship in *Vibrio cholerae*. *Revista Brasileira de Genética*, 9: 407-419.
- Shannon RC 1926. The occurrence of *Phebotomus* in Panama. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 16:190-193.
- Shaw PR, Prasad R 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4: 297-320.
- Sokal RR, Sneath PHA 1963. *Principles of numerical taxonomy*. W H Freeman. San Francisco 547pp.
- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News*, 22: 126-129.
- Swofford L, Selander RB 1981. BIOSYS – A computer program for the analysis of genetic of variation in genetics. User' manual.
- Van Driel JW, Sluiteres JF, Van Der Kaay HJ 1987. Allozyme variation in *Anopheles stephensi* Liston from Pakistan (Diptera: Culicidae). *Biochemical Genetics*, 25: 789-802.
- Waples RS 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine store fishes. *Evolution*, 41: 385-400.
- Wright S 1965. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Wright S 1978. *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations*, 4. University of Chicago, Chicago 580 pp.

## Conclusões Gerais

- O achado de infecção natural por uma leishmânia do subgênero *Viannia* e a ampla distribuição em concordância com o registro de casos humanos são fortes evidências de que *L. (N.) whitmani s.l.* seja o vetor da *Leishmania (V.) braziliensis* no Estado do Acre. Isto reforça seu papel como um importante elo da cadeia epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Amazônica.
- Numa visão epidemiológica macro-territorial, independente de estar transmitindo *Leishmania (V.) braziliensis* ou *Leishmania (V.) shawi*, sugere-se *L. (N.) whitmani s.l.* seja o mais importante transmissor da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.
- O registro de *L. (N.) whitmani s.l.* em todos os Estados brasileiros, em diferentes tipos de vegetação associados a climas variados, reforça a hipótese de que essa espécie seja um exemplo notável de adaptação aos diversos ambientes, inclusive aqueles duramente impactados.
- A análise da estruturação gênica das populações dos Municípios de Paragominas, Santarém, Londrina e Ilhéus, revelou um excesso de homozigotos, sugerindo uma baixa diferenciação genética intrapopulacional
- A população do Município de Paragominas se destaca por apresentar maior diferenciação genética, o que contribuiu para a formação de um ramo isolado na análise de agrupamento.
- As populações de *L. (N.) whitmani s.l.* dos Municípios de Paragominas, Santarém, Londrina e Ilhéus com base na análise isoenzimática, representa uma única espécie com grandes chances de sofrer subdivisões em decorrência da evolução.