UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Lutzomyia longipalpis* ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO SEGMENTO RIBOSSOMAL 12S DE DNA MITOCONDRIAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de Parasitas e Microorganismos do Instituto de Biociências-UNESP, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre.

ALUNA: LETÍCIA TSIEME GUSHI
ORIENTADOR: PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA

BOTUCATU / SP
2008

"Aos meus maiores ídolos, dedico este trabalho: meus pais Sérgio Seitoko Gushi e Célia Regina Santa Rosa Gushi por tanto apoiarem meus estudos, pelo amor incondicional e por serem minha força nos momentos de fraqueza".

"Certa vez, um sábio chinês presenteou o imperador com um livro. O livro tinha apenas duas páginas. Ao dá-lo, o sábio explicou: "No momento mais triste da sua vida, senhor imperador, leia a primeira página e feche o livro. E no momento mais feliz, leia a segunda. O presente terá atingido seu objetivo."

Tempos depois, o azar abateu-se sobre o império. Uma peste matou parte da população, uma praga destruiu a lavoura, bárbaros invadiram as terras saqueando o que sobrara. Desesperado, o imperador lembrou-se do livro: Na primeira página, somente uma frase curta: "Isso vai passar".Incansável e laborioso, ele convocou seus conselheiros e pediu o apoio de seu povo para expulsar os invasores, debelar a peste e recuperar a lavoura.

Mais tarde, sua única filha casou-se com o filho de um imperador vizinho e os dois países se uniram num único e imenso império. Feliz da vida, o imperador lembrou-se novamente do livro e foi direto à segunda página, onde se lia apenas outra frase curta: "Isso também vai passar".Moral da história: não devemos nos embriagar pelas grandes alegrias e nem nos deixar abater pelas grandes frustrações.".

Trecho retirado do livro: Transformando Suor em Ouro de Bernardinho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por fazer parte de uma minoria deste país que consegue concluir seus estudos e lutar pelos seus sonhos.

Agradeço ao meu orientador Paulo Ribolla, por confiar no meu trabalho e oferecer-me esta oportunidade dentro do seu laboratório, para que eu pudesse amadurecer profissionalmente. Uma pessoa admirável, sempre muito acessível e com palavras de incentivo para todos seus orientados, proporcionando-nos um ambiente de trabalho agradável e de liberdade plena no exercício da nossa criatividade.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por conceder a minha bolsa de mestrado durante o período de 24 meses, assim pude dedicar-me integralmente a este trabalho.

Agradeço à Doutora Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves, pesquisadora da Superintendência de Controle de Endemias no estado de São Paulo, por fornecer gentilmente os insetos utilizados neste estudo e por me oferecer a oportunidade de realizar o curso prático de Identificação Morfológica de Phlebotominae em Araçatuba.

Agradeço a equipe do Laboratório de Entomologia Molecular: Jayme, Karina, Diego, Letícia, Aline, Alberto, Bianca, Neto e Soneca por me passarem todos os conhecimentos que eu necessitei para realização deste estudo e pela paciência com os meus muitos erros cometidos durante o caminho.

Agradeço à Lilian Aparecida Colebrusco Rodas e a Neusinha por me receberem tão bem em Araçatuba, ministrando o curso de Identificação Morfológica de Phlebotominae, para que eu pudesse enriquecer meu trabalho.

Sou muito grata a Virginia Coscrato, do Departamento de Genética, por ter atenciosamente me socorrido nos últimos sequenciamentos que teimavam em dar errado.

Obrigada a todos docentes, funcionários e estagiários do Departamento de Parasitologia por me receberem sempre prestativos e carinhosos com todos.

Agradeço especialmente minha família, por sempre apoiarem as minhas escolhas, incentivando-me a lutar pelos meus objetivos. Muito obrigada: pai, mãe, minha irmã Lívia, meu cunhado Juliano e meu irmão Marcel por estarem sempre presentes na minha vida, nos bons e maus momentos, por todo amor, compreensão, carinho, confiança e respeito. Vocês são o meu porto-seguro nos momentos de insegurança. Amo muito todos vocês.

Agradeço meus avôs maternos Bortholo e Júlia e meus avôs paternos Francisco e Eunice por serem os alicerces sólidos de uma família muito especial e amorosa. Obrigada por todo carinho e amor incondicional que vocês dedicam a mim. Agradeço também a todos os meus tios por vibrarem com as minhas conquistas e

participarem de todos os momentos importantes da minha vida, agradeço especialmente aos meus tios Rosa e João Tancler, Celso e Marileide Gushi e meu tio Maurício Santa Rosa.

Obrigada aos meus amigos, a família que Deus me permitiu escolher, por todos os momentos de desabafos, de choros, de risadas, bagunça, churrascos, festas, por sempre estarem ao meu lado e vibrarem com o meu sucesso, por compreenderem minha ausência nestes últimos tempos, a vocês que sempre estarão em meus pensamentos: Kátia, Patrícia, Élen, Érica, Fer, Jú, Clívia "Tchutchuka" e Danilo, Gilsara "Kuel", Liri, Paula "Sedada", Luciana "Capitu", "Severina", Lígia "Xilema", Cristiane "Bolor", Sabrina "Maritaka", Gorete, Aline Benetti, Satie, "Ériquinha", Tarina, Paula Souza, Damon, "Eré", "Beto" e Alessa, muito obrigada por fazerem parte da minha vida! É o amor de vocês que me guia quando me perco ao longo deste caminho cheio de obstáculos que é viver.

E por último e não menos importante, meus sinceros agradecimentos a uma pessoa recém chegada a minha vida, mas que se tornou muito especial, obrigada ao Emanuel por todo carinho, compreensão e companheirismo.

Resumo

A leishmaniose visceral americana (LVA) é, primariamente, uma zoonose crônica, tendo como agente etiológico, nas Américas, protozoários da espécie *Leishmania chagasi*. Sua transmissão, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais, já ocorre em centros urbanos. É um crescente problema de saúde pública no Brasil sendo uma endemia em franca expansão geográfica. Está distribuída em 19 dos 27 Estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Entre 1985 e 2000, a leishmaniose atingiu no Brasil 422,5 mil pessoas.

O contínuo crescimento antrópico desordenado vivenciado nas grandes áreas urbanas do Estado de São Paulo, ocasiona em um gradativo aumento de áreas onde as condições precárias de moradia contribuem para o aumento da população de flebotomíneos. A região oeste do Estado de São Paulo registrou em 1998, pela primeira vez, um caso de cão infectado. A doença em cães, desde o primeiro registro, já foi notificada em 45 municípios, ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, São João da Boa Vista e Grande São Paulo. Em humanos, até junho de 2006, a doença já havia sido registrada em 34 municípios das regiões de Araçatuba. Bauru, Marília e Presidente Prudente. A espécie *Lutzomyia longipalpis* até junho de 2006 foi detectada em zona urbana de 68 municípios das regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente, e mais recentemente na região de São João da Boa Vista, no município de Espírito Santo do Pinhal. Desde então, a sua expansão vem sendo verificada a partir da adaptação do vetor em municípios vulneráveis. A importância do estudo da população destes insetos é para potencializar o combate e a erradicação de tal moléstia, além de incentivar esforços no sentido preventivo quanto a atividades sanitárias em detrimento das medidas polêmicas atualmente utilizadas que envolvem sacrifícios de animais. Entretanto, têm-se acumulado evidências que sugerem a existência de um complexo e não apenas uma espécie de *Lutzomyia longipalpis* na natureza. O objetivo deste estudo foi comparar diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis,* provenientes de alguns municípios paulistas onde o Programa de Vigilância e Controle da LVA detectou a presença da espécie vetora, e utilizamos como grupo externo uma população de Teresina (Piauí), utilizando - se para tal da amplificação do segmento 12S rDNA mitocondrial como ferramenta para estudar estas populações, verificando a variação intra-específica afim de acrescentar ferramentas para o melhor entendimento da introdução da doença no estado de São Paulo, e também para o combate do vetor no Brasil.

Palavras chaves: *Lutzomyia longipalpis,* 12S rDNA, estrutura populacional.

Abstract

American visceral leishmaniasis (AVL) is a chronic zooanotic disease that can affect the humans and is caused by *Leishmania chagasi*. Its transmission first was in wild areas or small agricultural localities, but recently it occurs in urban centers. It is an increasing problem in the Public Health in Brazil. It is distributed in 19 of 27 states of this country. Between 1985 and 2000 the AVL reached 422, 5 thousand people.

The continuous and disordered population growth in big urban centers at São Paulo state leads increase gradual areas where precarious conditions of habitation contribute to an increasing of vector population. The first register of AVL in this state was in 1998, an infected dog case. Since this first register, the disease was informed in 45 cities, divided in 6 administrative regions: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, São João da Boa Vista e Grande São Paulo. In humans even 2006 June was registered in 34 cities around Araçatuba region. The specie *Lutzomyia longipalpis* was

detected in urban areas of 68 cities of the: Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente and more recently São João da Boa Vista region. Since then its expansion comes being noticed with a vector adaptation in vulnerable cities. The studies about population this insect is important to control and eradicate the AVL, beyond stimulating efforts to prevention in detriment of sanity providences actuality utilized that involve animals sacrifices. However evidences have been accumulated that *Lutzomyia longipalpis* isn't single specie but is species complex in the nature. The objective this study was to compare different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* by amplification and sequencing the12S rDNA mitochondrial to study intra-specifics variations to understand the history of introduction this disease in São Paulo state and control your vector in Brazil.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*, 12 S rDNA, population structure.

1. Introdução

1.1. Histórico da Leishmaniose

A primeira observação dos agentes etiológicos das leishmanioses ocorreu no final do século XIX, quando CUNNINGHAM (1885), na Índia, descreveu formas amastigotas em casos denominados "Calazar". Posteriormente, em 1898, o pesquisador russo BOROVISKY demonstrou ser um protozoário o agente etiológico encontrado no oriente, sem, entretanto lhe dar nome. Mais tarde, LEISHMAN (1903), observou corpúsculos ovais com 2-3 µm de diâmetro em preparações de baço de um soldado inglês que havia morrido de febre Dum-Dum, contraída em Calcutá na Índia. Ao mesmo tempo, DONOVAN (1903), relatou esses mesmo parasitos em aspirados esplênicos de um menino hindu com 12 anos de idade e que estava acometido de uma febre irregular. LASVERAN & MESNIL em 1903 consideraram que o parasito associado ao calazar indiano um piroplasma, nomeando-o então de *Piroplasma donovani*. Ainda em 1903, ROSS demonstrou que os organismos evidenciados na preparação de DONOVAN não eram esporozoários como este havia proposto e estabeleceu um novo gênero (*Leishmania)* e denominou de *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar. Em 1904, ROGERS cultivou o protozoário em sangue citratado a 22ºC e demonstrou serem flagelados. Em 1908 NICOLLE & COMTE demonstraram pela primeira vez o parasito em cães na Tunísia, sugerindo seu possível papel como reservatório da doença. GENARO, 2005.

Em 1934, PENNA, relatou o primeiro encontro o parasita no Brasil, após examinar lâminas de cortes histológicos de fígados, obtidos por meio de viscerotomia *post-mortem* para o diagnóstico anatomopatológico da febre amarela, observou então o protozoário do gênero *Leishmania* em 41 lâminas GENARO, 2005.

Entre 1936 e 1939, Evandro Chagas e seus colaboradores realizaram extensos estudos demonstrando então a doença em homens e em cães e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como provável vetor e como agente etiológico nas Américas foi classificado como *Leshmania chagasi* CUNHA & CHAGAS (1937).

Lutzomyia longipalpis, flebotomíneo transmissor da leishmaniose visceral endemicamente encontrado na região nordeste do Brasil, foi originalmente identificado como transmissor de tal moléstia por LUTZ & NEIVA (1912).

Em 1969, MANGABEIRA, por meio de morfológicas e ecológicas observações observou diferenças morfológicas entre populações do Norte e Nordeste do Brasil, sugerindo pela primeira vez a existência de um complexo de espécies dentro da espécie *Lu. longipalpis*. Desde então, o acúmulo de evidências sugere a existência de um complexo e não apenas de uma espécie deste transmissor, em virtude da sua enorme diversidade presente nas diferentes partes do mundo.

FORATTINI *et al.* (1970) relata o encontro de indivíduos da espécie no estado de São Paulo, na cidade de Salto de Pirapora.

Na última década houve um grande aumento de estudos genéticos desses flebotomíneos com evidências que mostram a existência de um complexo de *Lutzomyia longipalpis* na natureza, cuja diferenciação é taxonomicamente indistinguível pela proximidade das suas características morfológicas, mostrando-se em muitos casos problemática ou impossível BAUZER (2002).

Atualmente as técnicas bioquímicas e moleculares têm sido amplamente utilizadas na identificação das espécies ou cepas de parasita. O DNA ribossomal (rDNA), tem sido bastante explorado nos estudos de seqüências nucleares em análises de evolução, por apresentar vantagens como o alto ritmo de mutações no ITS2 (espaço interno transcrito 2), rapidez, fácil uso e abrangência de múltiplos sítios alvo, o que pré-define esse tipo de sistema de marcadores. Outra técnica utilizada para o estudo de variabilidade genética é a de microsatélites, que são seqüências de DNA com unidade de repetição pequena, no máximo 6bp e comprimento total que geralmente não excede 200bp. Os microsatélites estão amplamente distribuídos no genoma de eucariotos e são bastante polimórficos.

Neste sentido, o objetivo do projeto é adaptar e aplicar a metodologia 12rDNA para a análise genética de populações de *Lutzomyia sp,* visando a sua utilização no estudo de monitoramento de diferentes espécies, cujo propósito reside na análise de diversidade genética.

1.2. Ciclo de transmissão da Leishmaniose Visceral Americana, MICHALICK & GENARO (2005).

O ciclo biológico da *Leishmania chagasi,* protozoário causador da Leishmaniose Visceral Americana, é do tipo heteroxênico, isto é possui hospedeiro intermediário e definitivo, e possui como transmissor as fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, denominado também de hospedeiro invertebrado; onde são encontradas as formas promastígotas e paramastígotas, estas se localizam no lúmen do trato digestório.

As fêmeas de *Lu. Longipalpis* necessitam de alimentação sangüínea (repasto sangüíneo) para o desenvolvimento dos ovos, ao se alimentarem do sangue de um animal infectado, as fêmeas

ingerem juntamente com o sangue, macrófagos e monócitos parasitados pelas formas amastígotas. Estas células parasitadas rompem-se liberando as formas amastígotas que após divisão binária transformam-se em promastígotas arredondadas e de flagelo curto, que se dividem intensamente ou alongadas de flagelo longo cujo processo de divisão é bem menos intenso. Cerca de 48 a 71 horas após o repasto sangüíneo a matriz peritrófica se rompe liberando as formas promastígotas livres que migram para o intestino anterior. Na válvula estomadeo, no esôfago, na faringe e no cibário são encontradas: paramastígotas metacíclicas que são infectantes para o hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasito ocorre quando as fêmeas infectadas se alimentam em vertebrados susceptíveis.

No local da picada do inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas injetadas são fagocitadas por células do SMF, onde encontram condições ideais para sua multiplicação, imediatamente transformam-se em formas amastigotas e iniciam sua multiplicação por divisão binária no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Quando estão densamente parasitados, os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos dando continuidade a sua multiplicação dentro do hospedeiro.

No hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas da espécie *L. chagasi*, parasitam células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente os macrófagos. No homem estas formas amastigotas localizam-se em órgãos linfóides, como a medula óssea, baço e linfonodos. No hospedeiro invertebrado *Lutzomyia longipalpis,* são encontradas as formas paramastígotas, promastígotas e promastígotas metacíclicas ao longo do intestino médio e anterior.

Anteriormente a transmissão da doença era relatada somente em áreas silvestres e rurais; atualmente é relatada em centros urbanos. Acredita-se que um dos fatores que contribui para esta mudança seja a maior adaptação do inseto a estas áreas. No entanto, os criadouros do inseto em área urbana ainda não são conhecidos, o que dificulta o controle das populações de insetos nestes locais.

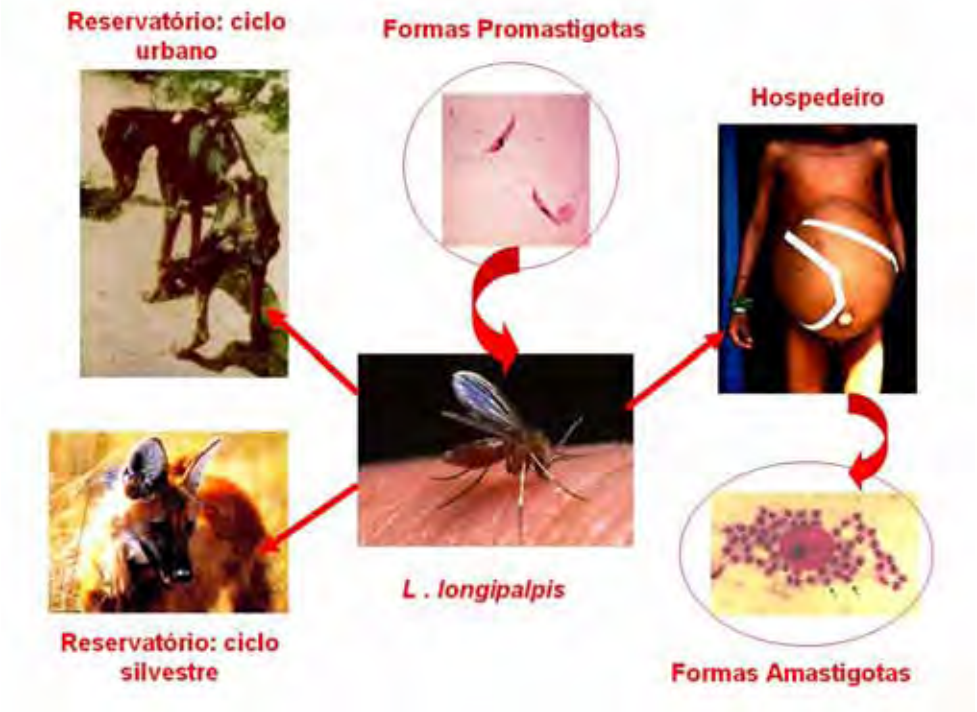


Figura 1: Representando o ciclo biológico da doença.
Fonte: www.brilhantels.com

1.3. O vetor

O principal mecanismo de transmissão da *L. chagasi* em condições naturais e de importância epidemiológica ocorre através da picada da fêmea de *Lu longipalpis* nas quais as formas metacíclicas movimentam-se livremente na probóscida e são inoculadas no hospedeiro através do repasto sangüíneo. Alguns autores acreditam que em decorrência do intenso parasitismo e de enzimas produzidas pelos parasitos no intestino anterior do inseto, possa ocorrer um bloqueio e lesão da válvula proventricular, provocando então, a regurgitação dos promastígotas para a derme do vertebrado no momento da alimentação do flebotomíneo. (MICHALICK & GENARO, 2005)

Os insetos veiculadores da *Leishmania sp.* pertencem a família usualmente denominada de Psycodidae. Essa família apresenta seis subfamílias: Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Horaiellinae, Psychodinae, Phlebotominae e Sycoracinae. Sendo somente as duas últimas de importância médica, devido aos hábitos hematófagos de suas fêmeas. As fêmeas da subfamília Sycoracinae alimentam-se do sangue de vertebrados heterotermos, já as fêmeas da subfamília Phlebotominae alimentam-se do sangue de anfíbios, répteis, aves e mamíferos, inclusive o homem. Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em diversas condições climáticas e de altitude, em ambientes silvestres, rurais e urbanos.

No Brasil, são popularmente conhecidos como: asa branca, birigui, cangalhinha, flebótomo (ou freboti), mosquito-palha e tatuquira.

Medem de 2 a 4 mm de comprimento, possuem o corpo coberto por pêlos finos, apresentam escamas intermescladas sobre as asas e esternitos abdominais. Estes insetos possuem como característica acentuada, a posição da cabeça formando um ângulo de 90º em relação ao eixo longitudinal do tórax; quando vivos, em posição de repouso, as asas são mantidas divergentes em posição semi-ereta; possui extremidade posterior do abdome bem diferenciada: sendo nos machos bifurcada e nas fêmeas pontiaguda ou ligeiramente arredondada (Figuras 2 e 3). Suas peças bucais são do tipo sugador pungitivo, constituídas pelo labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio. Nos machos, geralmente a mandíbula está ausente. Pouquíssimos grupos apresentam a mandíbula rudimentar GALATI (2003), o que os incapacita de penetrar a pele de vertebrados e portando os impedem de alimentarem-se de sangue. Portanto, somente as fêmeas alimentam-se de sangue, o qual é a fonte de proteínas e aminoácidos necessários para o desenvolvimento dos ovos.

Quanto à necessidade de açúcar, esta ocorre em ambos os sexos, tanto machos quanto fêmeas necessitam de carboidratos como fonte de energia. Estudos sobre flebótomos capturados em campo revelaram a presença da melesitose e do seu produto da hidrólise, a tiranose, em seus tratos digestórios. A melesitose é um constituinte da substância pegajosa excretada por afídios (pulgões) e depositada sobre a superfície das folhas e caules de plantas em que se alimentam da seiva; trata-se de uma substância produzida dentro do sistema digestório destes insetos. Outro açúcar encontrado na substância pegajosa é a frutomaltose, cujos produtos de decomposição (maltose, sacarose, glucose, frutose) são os açúcares mais comumente encontrados nos flebotomíneos capturados em campo.

Os promastígotas de *Leishmania* necessitam de açúcares para se desenvolver e se multiplicar no trato digestório destes insetos, portanto acredita-se que a distribuição geográfica da doença pode depender da disponibilidade de fontes naturais de carboidratos.

Figura 2 (à esquerda): Macho de *Lutzomyia sp* **Figura 3 (à direita):** Fêmea de *Lutzomyia sp* (fonte: www.antropozoonosi.it/vettori/flebotomi.htm).

1.4. Ciclo Biológico dos Flebotomíneos, WILIAMS & DIAS (2005)

Pouco se conhece sobre os locais de desenvolvimento dos flebotomíneos, suas formas imaturas têm sido encontradas, geralmente em pequeno número, em detritos de fendas rochosas, no chão de cavernas, no solo entre raízes de árvores, debaixo de folhas mortas e úmidas de florestas. A única informação segura é que os flebotomíneos desenvolvem-se em substrato úmido, porém não molhado rico em matéria orgânica em decomposição. Devido à dificuldade de encontrar os locais naturais de desenvolvimento, a maior parte das informações sobre os estágios imaturos provém das observações das criações em laboratório. Acredita-se que neste substrato rico em matéria orgânica a fêmea deposita seus ovos que possuem como características serem alongados, elípticos, ligeiramente recurvados e esbranquiçados. Medem de 300 a 500 micrômetros. Destes ovos eclodem as larvas que irão passar por 4 estádios larvais. Apresentam a cabeça bem definida e escura. Seu corpo é vermiforme, com três segmentos torácicos e nove abdominais, os quais apresentam pseudópodos que permitem a locomoção das larvas no substrato. Após atingir o quarto estádio larval o próximo estágio, o de pupa, estas são cilíndricas, medem cerca de 2 mm. Possuem um cefalotórax sem segmentação nítida e uma abdome com nove segmentos. A extremidade posterior do abdome da pupa é envolvida pela exúvia do quarto estádio larval. Da pupa emerge o inseto adulto. (Fig.4)

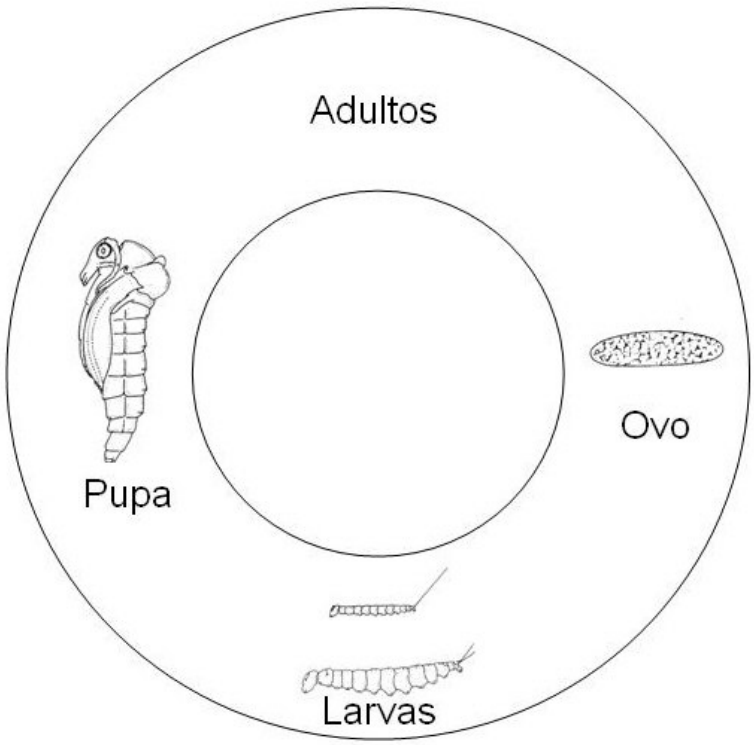


Figura 4: Ilustração dos estágios evolutivos do vetor.(Fonte: WILLIAMS & DIAS, 2005)

1.5. Identificação Morfológica de Flebotomíneos

Para que seja possível a identificação morfológica das espécies de flebotomíneos, são necessários tratamentos denominados: clarificação e em alguns caso coloração dos insetos para que possam ser visualizadas as estruturas importantes para a leitura da chave de identificação (Figura 6). Após estes processos, o espécime é dissecado, para ser preparada a lâmina. Os machos são divididos em: cabeça e tórax, sua cabeça é posicionada de forma dorso-ventral e o tórax e abdome em posição lateral, já as fêmeas são separadas em: cabeça, tórax e abdome, e posicionada de forma que a cabeça fique de forma ventral, e o tórax e abdome em posição lateral. São observadas então em microscópio óptico, as estruturas presentes nas chaves de identificação dos táxons da América, que foram desenvolvidas de acordo com a classificação de Galati (1995), esta classificação é utilizada principalmente no estado de São Paulo no entanto, existem outras classificações que também são utilizadas. Este método de identificação requer habilidade e experiência na montagem e análise das lâminas, pois muitas vezes a manipulação do inseto leva a perda ou deslocamento de estruturas importantes para se seguir as chaves de identificação e por se tratar de um inseto muito pequeno é necessário um bom treinamento para realizar a identificação das espécies, já que são estruturas delicadas e difíceis de serem observadas. Quando a fauna local já foi previamente estudada e se tem conhecimento das espécies que ocorrem no local; para tornar mais ágil o processo de identificação, já que analisam grandes números de lâminas, os profissionais do órgão responsável pelo controle da doença no estado de São Paulo, a Superintendência de Controle das Endemias - SUCEN identificam as espécies através das suas genitálias. Nos machos observam-se os ductos ejaculadores e a bomba ejaculadora e nas fêmeas observam-se: na cabeça o cibário e no abdome as espermatecas com seus ductos individuais. Cada espécie possui uma morfologia bem diferenciada como está exemplificada na Figura 5, onde se observa um esquema das genitálias de diferentes espécies de flebotomíneos como são vistas em lâmina após o processo de clarificação e montagem dos insetos.

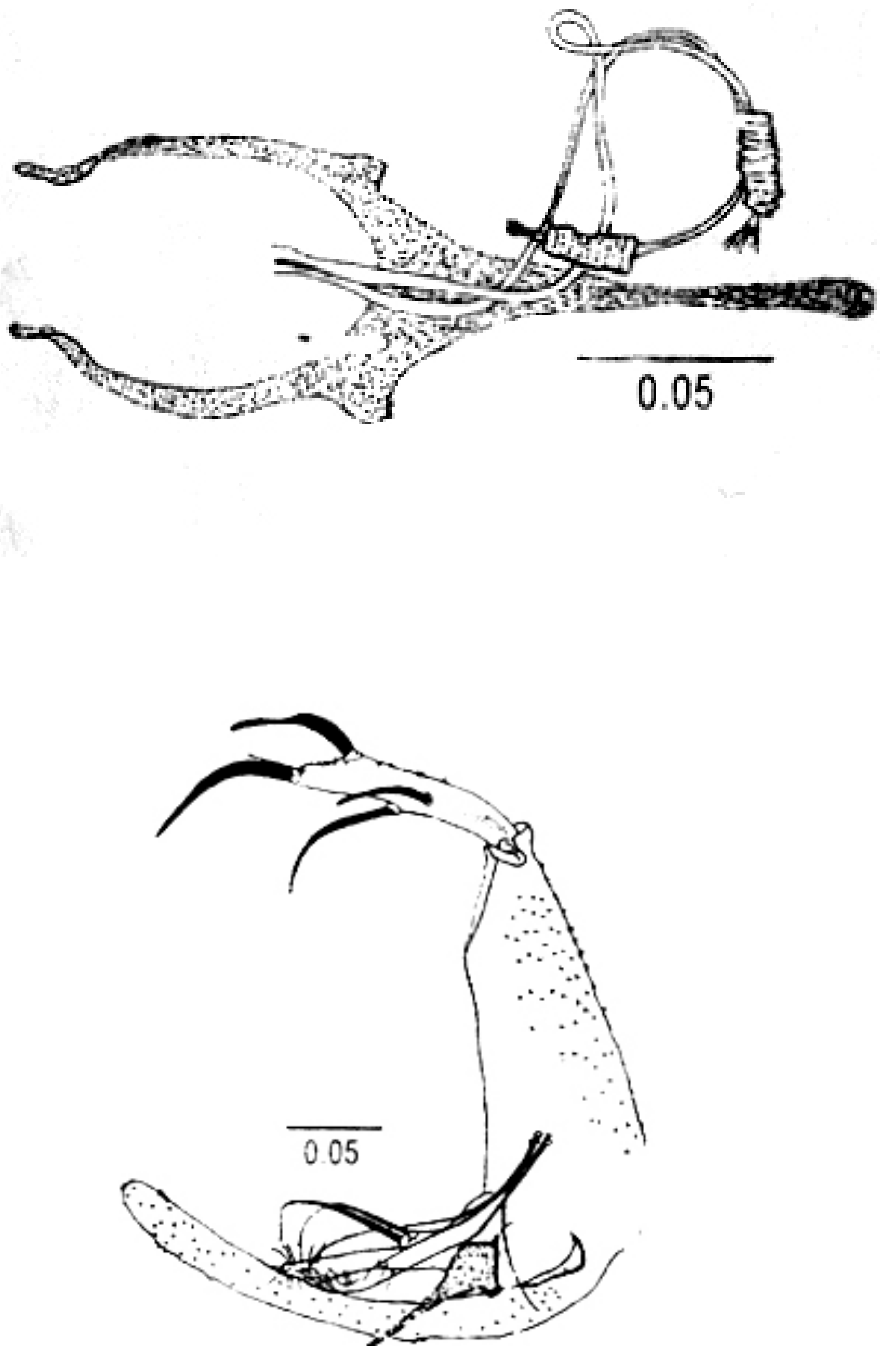


Fig. 5: Esquema de espermatecas, ductos espermatecais e forquilha genital de fêmea e terminália de macho da espécie *Lutzomyia longipalpis*. (Fonte: WILLIAMS & DIAS, 2005)

Figura 6: Extremidade posterior do abdome de uma fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* e **Figura 7:** Extremidade posterior do abdome de um macho da espécie *Lutzomyia longipalpis*, observadas em microscópio de luz.

1.6. Controle do vetor

O programa brasileiro de controle da leishmaniose visceral possui três medidas básicas para impedir o avanço da doença no país: a detecção e tratamento de casos humanos, a eliminação de reservatórios domésticos e controle dos vetores da área de foco, ou seja, a área que compreende em 200 m em torno do caso humano ou canino notificado pelos órgãos responsáveis FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2003.

Para o controle do vetor, de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo, 2006, são tomadas as seguintes medidas:

1. Manejo ambiental: Consiste na poda de árvores, eliminação de matéria orgânica do solo e de vegetação em quintais e jardins (peridomicílio), praças, parques públicos e terrenos baldios, para que assim diminua-se a quantidade de matéria orgânica e locais sombreados, condições que são favoráveis ao estabelecimento de criadouros do vetor.
2. Controle químico: Aplicação de inseticida de ação residual nos municípios com transmissão humana durante o período climático favorável ao aumento da densidade do vetor, que compreende no período de dezembro a fevereiro. A aplicação do inseticida deve ser realizada pelos municípios, e de deve abranger o intra e peridomicílio dos imóveis da área foco delimitada. Os inseticidas atualmente recomendados pelo Ministério da Saúde, para tal controle, são os inseticidas do grupo dos piretróides sintéticos. Para os diferentes tipos de acabamentos das paredes a serem tratadas há uma formulação adequada que deve ser rigorosamente seguida.
3. Atividades educativas: Consiste na sensibilização da população quanto sua participação no combate e controle da doença para isso é necessário o desenvolvimento de práticas de educação em saúde voltadas para uma melhoria da qualidade de vida, individual e coletiva, levando à população informações sobre a doença e sua prevenção. Para o sucesso desta atividade é importante o envolvimento não apenas dos órgãos responsáveis pelo controle da doença e sim incluir a participação de todos os profissionais de saúde e dos membros da comunidade. São as seguintes ações que a população deve adotar para o combate à Leishmaniose Visceral:
    - Notificar ao órgão responsável pelo combate de doenças a presença de insetos incômodos picando durante a noite;
    - Redução de possíveis criadouros através da freqüente poda de árvores e gramados e a retirada de matéria orgânica do solo;
    - Instalar tela de malha fina nas residências para minimizar o contato do vetor com a população humana;

- Notificar a presença de cães sintomáticos e entregar o animal doente ao setor responsável do município;
- Colaborar com a equipe de saúde nos inquéritos sorológicos ou nas atividades de investigação do foco, facilitando a coleta de amostras de sangue durante a busca ativa de cães assintomáticos e recolhimento de cães doentes e soropositivos para a doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde - OMS considerou a Leishmaniose como a segunda doença de importância pública causada por protozoário nos quatro continentes, considerando-a endêmica em 88 países dos quais, 72 estão em desenvolvimento. Assim, 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão. No Brasil, encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e no Sudeste RATH *et. al.*(2003).

Pelo menos vinte espécies de *Leishmania* foram identificadas nas Américas as quais foram agrupadas em quatro complexos de acordo com as características clínicas da doença: leishmaniose cutânea persistente, cutânea difusa, muco-cutânea e leishmaniose visceral, tendo como principais responsáveis respectivamente pela *Leishmania (L.) mexicana, Leishmania (L.) amazonensis, Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) chagasi* GRIMALDI & TESH (1993), DESJEUX (1996).

Quanto à descrição de sua estrutura organizacional, existe uma enorme dificuldade na elaboração da taxonomia e sistemática deste gênero devido a grande semelhança morfológica das várias espécies. De acordo com LAINSON & SHAW (1987), de uma maneira geral, podem-se distinguir dois subgêneros apresentados como *Leishmania* e *Viannia*, tomando-se por base o desenvolvimento do parasita em seu vetor natural, na pele de hamsters e em meio de cultura ágar sangue.

Portanto, a especiação, ou seja, a identificação da origem das espécies dentro destes dois subgêneros depende de vários fatores segundo MARFURT *et al*. (2003): distribuição geográfica, apresentação clínica da doença, espécie do vetor e reservatório animal. A identificação do agente causal e sua relação com seus vetores transmissores e reservatórios são necessárias para o desenvolvimento e implantação das medidas de controle em pauta.

O contínuo crescimento antrópico vivenciado nas áreas urbanas do estado de São Paulo nos últimos anos é responsável por apresentar profundas alterações no meio ambiente como um todo, revelando expressivas reduções na cobertura vegetal de suas reservas nativas, acompanhado de perto pelo gradativo aumento da população de baixa renda, onde a falta de saneamento básico e as más condições peri-domiciliares contribuem, por conseqüência, para a composição da fauna

flebotomínica presente em maior densidade e de forma endêmica sob estas condições no final deste século TOLEZANO *et. al* (2001). Assim, algumas espécies de flebótomos do gênero *Lutzomyia,* encontram características propícias para colonizar o círculo peri-domiciliar em áreas desmatadas, mantendo altos focos de transmissão de *Leishmania* neste novo ambiente.

A transmissão da *Leishmania* ao homem, naturalmente influenciada pelas condições supra descritas, se dá pela picada das fêmeas de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* no "Novo Mundo" e *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no "Velho Mundo". No Brasil, a LVA tem como principal vetor a *Lutzomyia longipalpis* GENARO (2005).

Ward *et al*. (1983) realizaram experimentos de cruzamento em laboratório e identificaram duas formas sexualmente isoladas. Em 1988 Ward *et al.* Realizaram novamente cruzamentos em laboratório somados à analises de feromônios e cantos de corte, concluindo que populações que produziam ferômonios distintos estavam reprodutivamente isoladas. Neste estudo também ocorreu o primeiro relado de comunicação sonora entre os indivíduos da espécie *Lu longipalpis*.

Em relação à diferenciação dos flebotomíneos através do DNA, um dos primeiros relatos realizado por LANZARO *et al*. (1993) com o uso da técnica denominada de "polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição" (RFLPs), indicaram uma alta variabilidade existente entre populações encontradas na Colômbia, Brasil e Costa Rica. Anos depois, DIAS *et. al.* (1998) utilizando polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), e comparando quatro populações de *Lutzomyia longipalpis* nestes mesmos países, na Ilha de Marajó, PA, onde o iniciador OPG-01 identificou a população estudada com um fragmento de 629bp, já as outras três (Gruta da Lapinha, MG; Melgar, Colômbia e Libéria, Costa Rica), não apresentaram distinção.

Uma variabilidade associada às populações de *Lutzomyia longipalpis* tem sido observada em vários níveis incluindo morfológicos, isoenzimáticos, bioquímicos e moleculares URIBE (1999). Vários autores têm utilizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual tem revolucionado as técnicas de diagnóstico de várias doenças e variações inter - e intra-específica das espécies.

Em 2000 Arrivillaga & Feliciangeli por meio de estudos morfológicos analisaram indivíduos da espécie e observaram que larvas morfologicamente diferenciadas originavam adultos que apresentaria diferentes perfis isoenzimáticos o que indicaria uma separação genética entre eles. Em 2001 Arrivillaga & Feliciangeli, utilizando-se de analises de caracteres morfométricos descrevem na Venezuela uma nova espécie *Lu pseudolongipalpis*.

Na identificação dos vetores da leishmaniose no Velho Mundo cutânea MUKHOPADHYAY *et. al*. (2000) estudaram, através da RAPD, os vetores *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi* e conseguiram diferenciar as espécies deste gênero. No ano seguinte, PEIXOTO *et al*. (2001), usando iniciadores degenerados para isolar fragmentos de *Lutzomyia longipalpis*, estudaram dois genes *cacophony* e *period* e concluíram que esses novos marcadores moleculares podem ser

utilizados em genética de populações e estudos de evolução em flebotomíneos, estabelecendo um preliminar mapa genético.

Soto *et al.* (2001) realizaram estudos moleculares através de analises da variação de nucleotídeos no gene mitocondrial ND4, sugerindo a existência de espécies irmãs na Colômbia e Brasil.

Desta forma, estes estudos moleculares discutem a possibilidade de que a *Lutzomyia longipalpis* é formada por um complexo de espécies, e por esta razão HODGKINSON *et al*. (2002) usando polimorfismo de conformação na fita simples (SSCP), mostraram existir diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* por meio do haplótipo citocromo B mitocondrial.

Num empenho de melhor entender a dinâmica das populações e a especiação dos flebótomos, WATTS *et al.* (2002), através de marcadores microsatélites, estudaram populações de *Lutzomyia longipalpis* obtidas em laboratório observando sua alta heterozigosidade. MAINGON et al. (2003).

BAUZER *et. al*. (2002) estudando *Lutzomyia longipalpis* de Jacobina (BA), Lapinha (MG) e Natal (RN), num total de 167 seqüências obtidas de 66 amostras, descrevem o polimorfismo molecular caracterizado com um fragmento de 266 pb*,* identificando uma alta diferenciação entre as populações analisadas. Estes resultados foram somados a trabalhos sobre ferômonios e sons de cópula, sugerindo a existência de um complexo de espécies correlatas no Brasil.

BEATI *et al.* (2004) realizaram um estudo sobre sistemática molecular entre diferentes espécies do gênero *Lutzomyia* para o qual utilizaram como ferramentas de análises seqüências dos segmentos de genes ribossomais 12S e 28S, descrevendo assim por meio molecular, diferentes espécies de tal gênero ocorrentes na Colômbia e Peru.

Há algum tempo, a PCR-RFLP do ITS-rDNA tem sido utilizada na identificação molecular de espécies de *Aedes* WEST *et al.* (1997), bem como na separação de espécies semelhantes de helmintos EOM *et al.* (2002). DEPAQUIT *et al.* (2002) pesquisando espécies de *Phlebotomus sergenti* e *Phlebotomus similis* com o propósito de identificar o transmissor da *Leishmania tropica,* utilizaram *primers* ITS 2, e observaram grande variação nas seqüências e uma alta suscetibilidade. Mais recentemente, KAMPEN *et al.* (2003) baseando-se nas seqüências do gene ribossomal ITS 2, desenharam *primers* para diferenciar espécies correlatas do mosquito *Anopheles*.

O genoma dos eucariotos contém diversas cópias do gene codificador do RNA ribossomal. Este inclui repetições *tandem* das regiões codificadoras 18 S, 5.8 S, 28 S e das regiões espaçadoras conhecidas como “transcritas internas” (ITS 1, região espaçadora transcrita interna 1 e ITS 2, espaçadora transcrita interna 2). As regiões codificadoras possuem seqüências muito conservadas e são separadas pelas regiões transcritas internas, que são regiões não codificadoras e, portanto, muito variáveis segundo PALUMBI (1996).

A presença das seqüências altamente conservadas (18 S, 5.8 S e 28 S) flanqueando regiões muito variáveis (ITS 1 e ITS 2), favorece a construção de iniciadores universais, que podem ser

utilizados na PCR permitindo o estudo de diferentes espécimes oriundos de diferentes regiões. Assim, diante dessa facilidade de construção dos iniciadores e ainda pelo fato do rDNA possuir regiões que sofrem taxas evolutivas distintas (regiões codificadoras e espaçadoras), este, tem sido amplamente utilizado em estudos de relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos.

Pouco é conhecido sobre as relações filogenéticas entre populações de *L. longipalpis*. Este conhecimento é necessário para o desenvolvimento de modelos que possam fornecer uma melhor compreensão da atual distribuição geográfica e os processos de especiação para os membros desse complexo de espécies ARRIVILLAGA *et. al*, (2006).

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

- Adaptar e aplicar a metodologia de amplificação e seqüenciamento da região 12S rDNA mitocondrial para a análise genética de diferentes populações da espécie *Lutzomyia longipalpis,* tendo como foco a questão de ser ou não um complexo de espécies.

- Aplicar a técnica de amplificação e seqüenciamento da região 12S rDNA mitocondrial para verificar as interações e variações intra-específicas de *Lutzomyia longipalpis* que compõem as comunidades.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de insetos foram coletadas de distintas regiões geográficas do Brasil: pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) na cidade de Araçatuba e região, no Estado de São Paulo; e também pelos centros responsáveis nos Estados de Piauí.

4.2. COLETA DOS INSETOS

As coletas dos insetos foram realizadas através de capturas manuais e armadilhas elétricas. A coleta manual foi realizada com aspiradores elétricos, restringindo-se o emprego do capturador de Castro a locais em que houvesse dificuldade de realizar a captura com o aspirador. O ponto selecionado é previamente avaliado para o estabelecimento do melhor local de captura no peri-domicílio, devendo ser pesquisados os locais propícios para o repouso dos flebotomíneos e de possíveis criadouros, assim como o local onde estão os animais domésticos. Em cada ponto selecionado foram instaladas armadilhas elétricas por um período de 12 horas, iniciando-se,

também, 30 minutos após o crepúsculo. Ao final deste período, um capturador faz a troca dos copos coletores.

Os insetos coletados, tanto nas capturas manuais como àqueles capturados por armadilhas CDC, foram acondicionados nos copos coletores, recobertos com gesso, pré-umedecido, até o momento em que são encaminhados ao Laboratório de Flebotomíneos do Serviço Regional da SUCEN e identificados.

4.3.EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Os insetos foram conservados em álcool 70% e posteriormente triturados com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 ml em 300 µl da solução de resina Chelex 5%. Misturou-se a solução com ajuda de vortex por 15s. Centrifugou-se por 20s a 13000 rpm. Levou-se a banho-maria 80ºC por 30 min. Misturou-se a solução mais uma vez por 15 s no vortex. Centrifugou-se por 20s a 13000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo eppendorf devidamente esterilizado e depois congelado.

4.4. REAÇÃO DE PCR DA REGIÃO 12 S.

Para a amplificação do espaço região 12S rDNA mitocondrial, foi realizada uma reação em cadeia de polimerase (PCR), com iniciadores utilizados em estudos prévios com *Lutzomyia sp*. por Beati, L. et. al, 2004. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: T1B(5´-AAACTAGGATTAGATACCT-3´) e T2B(5´-AATGAGAGCGACGGGCGATG-3´). Para reação, contendo um volume total de 25 µl foi utilizado: 2,5 µl de tampão 10x (Plantinum, Invitrogen Life Technologies), 1,0 µl de $MgCl_2$ (50mM), 0,5 µl dNTPs (0,1 mM) (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies); 1,0 de cada oligonucleotideo (10 pmol/µl); 0,3 Taq Plantinum, Invitrogen Life Technologies (5 U/ µl) e 5,0 µl da solução contendo DNA. A reação foi levada ao termociclador por 5 ciclos de desnaturação a 94ºC por 15s; anelamento 51º C por 30s; alongamento a 68ºC por 30; seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94ºC por 15s; anelamento a 53º C por 30s e alongamento a 70º C por 30s. O alongamento é completado com um ciclo de 70ºC por 5min. Os fragmentos amplificados de DNA foram visualizados, após eletroforese em gel de agarose, na concentração de 1%, corado com brometo de etídeo; para observação foi utilizada luz U.V.

4.5. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 12 S rDNA MITOCONDRIAL

As amostras resultantes da reação de PCR foram purificadas com auxílio do Kit EXOSAP - IT, conforme o protocolo do fabricante.

A reação de seqüenciamento contendo um volume total de 20µl cada, foi realizada utilizando-se 2µl de BigDye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech); 6,0µl de Save Money; 3,2µl de um dos iniciadores (1pmol/µl); 4,8µl de água ultrapura e 4,0µl de DNA (50ng/µl). A programação utilizada para a reação de seqüenciamento inclui um ciclo de 35 vezes a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos em termociclador (MJ Research modelo PTC100-96V). Uma vez realizada a reação, o DNA amplificado foi precipitado utilizando-se 80µl de isopropanol 65%, deixando-se no escuro por 20 minutos. A mistura foi centrifugada por 25 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado com 200µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado novamente com auxílio de uma pipeta e o DNA precipitado foi secado à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Após a secagem das amostras, foram adicionados 3,0µL de tampão de carregamento Loading Dye (kit do BigDye Terminator). As amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos para desnaturação das fitas e levadas ao gelo sendo imediatamente depois aplicadas no gel e levadas ao seqüenciador automático ABI377.

4.6. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

As seqüências das fitas 5´- 3 e 3´- 5 foram alinhadas utilizando-se do pacote EMBOSS GUI (http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS/) via internet com o auxílio do programa *merger,* onde foi obtido o alinhamento consenso.

Os consensos adquiridos de cada isolado foram alinhados no programa computacional Clustal X (THOMPSON *et al.,* 1997). As análises de similaridades genéticas e filogenias foram realizadas no software MEGA 3.1 utilizando como parâmetro o método Neighbor-Joining para a construção da árvore filogenética. Os polimorfismos entre as seqüências foram analisados através do programa DNA SP 4.10 (JULIO ROZAS *et al*., 2006

5. RESULTADOS

Foi extraído o material genético de um total de 120 indivíduos, sendo 30 indivíduos para cada população: Andradina, Araçatuba, Birigui e Teresina, conforme estão representadas na figura 8. Foi realizada a PCR e em seguida observado fragmentos de aproximadamente 360 p.b., assim como descrito por (Fig.9). Para todos os indivíduos apenas o produto de 360 p.b. foi visualizado no gel, indicando que a reação é específica e reprodutiva em 100% dos casos.

Ao analisar as seqüências, observou-se similaridade entre as seqüências obtidas das populações analisadas no estudo e as seqüências depositadas no GENBANK, porém apresentando alguns SNPs (Fig.10). A sequência similar obtida do banco de dados é referente a um espécime de *Lutzomyia longipalpis* coletado na Colômbia (BEATI ET AL., 2004). Os consensos adquiridos de

cada isolado foram alinhados no programa computacional Clustal X (THOMPSON *et al.,* 1997). Estes sítios polimórficos estão espalhados por toda a sequência. Não foram detectadas deleções e/ou inserções nas seqüências de *Lutzomyia longipalpis* coletadas no Brasil. A única exceção foi o aparecimento de uma inserção de 1 nucleotídeo na seqüência do indivíduo proveniente da Colômbia.

As análises de similaridades genéticas e filogenias foram realizadas no software MEGA 3.1 utilizando como parâmetro o algoritmo de Kimura (Kimura 2 parâmetros) que leva em conta a ocorrência de transições e transversões, dando pesos diferentes para estas duas modificações. Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o método Neighbor-Joining (Fig.11). Podemos observar na árvore 3 grupos distintos de indivíduos, um, localizado em um ramo basal, que contem a maioria das seqüências com representantes das 4 populações analisadas. Um ramo se destaca na parte superior da árvore e contem apenas indivíduos provenientes do Piauí. Este grupo também contém a seqüência proveniente do indivíduo da Colômbia. Outro ramo na parte inferior da árvore contém apenas indivíduos de Araçatuba. Este ramo mostra grande diversidade com vários haplótipos.

Figura 8: Mapa geográfico indicando as populações analisadas.

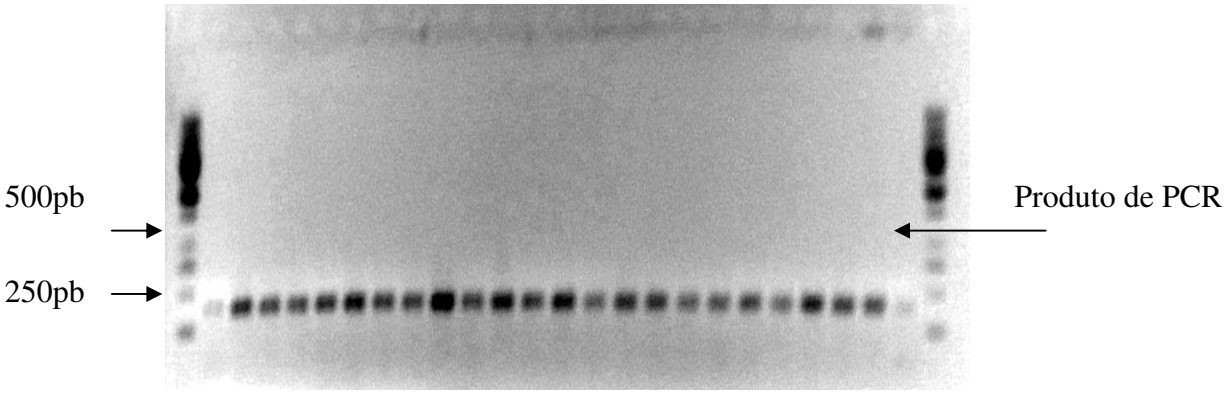
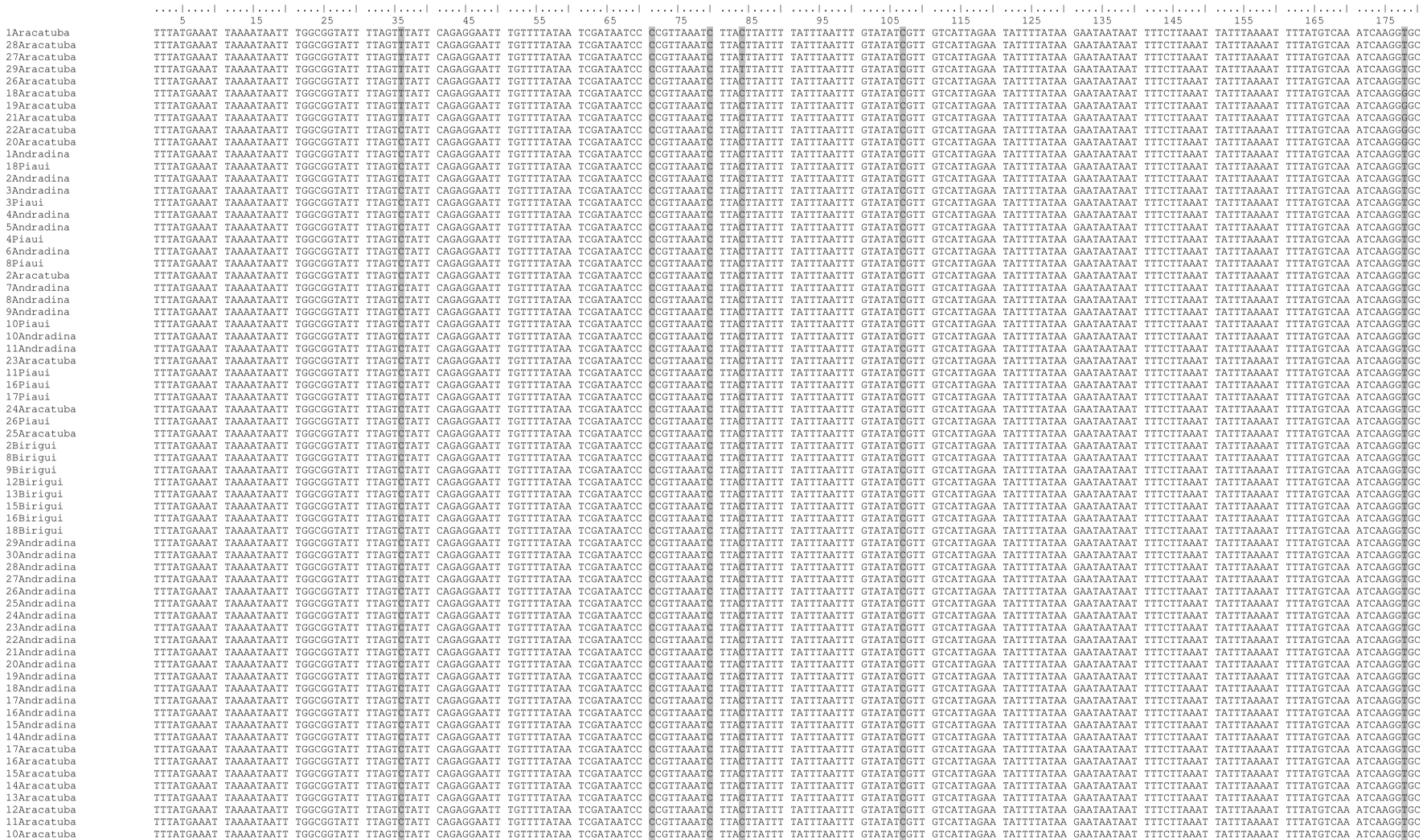
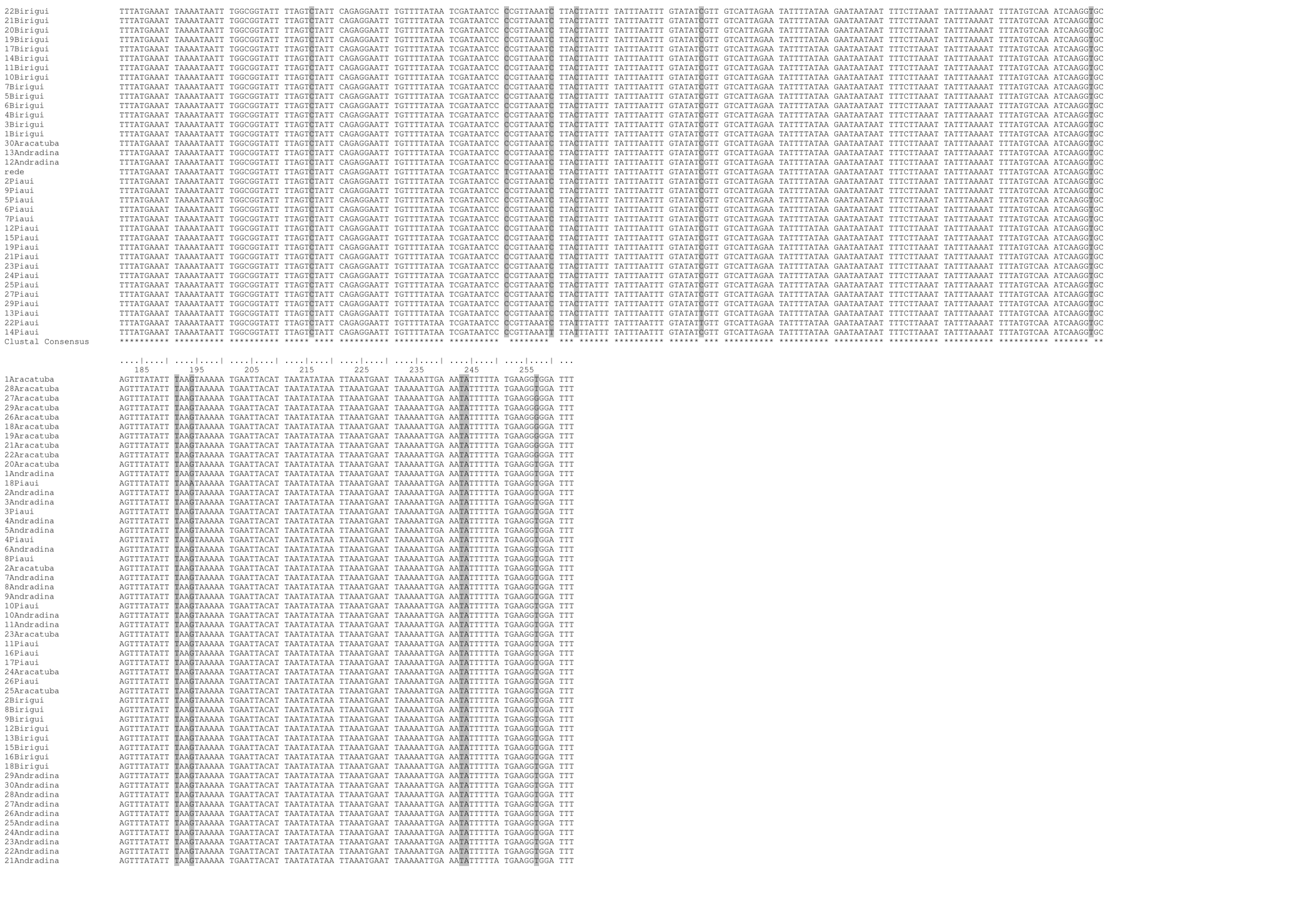


Figura 9: Gel de agarose, visualizado em luz U.V. À esquerda do gel indicado por setas está o padrão de tamanho molecular e à direita os produtos da PCR para a região 12S rDNA mitocondrial.





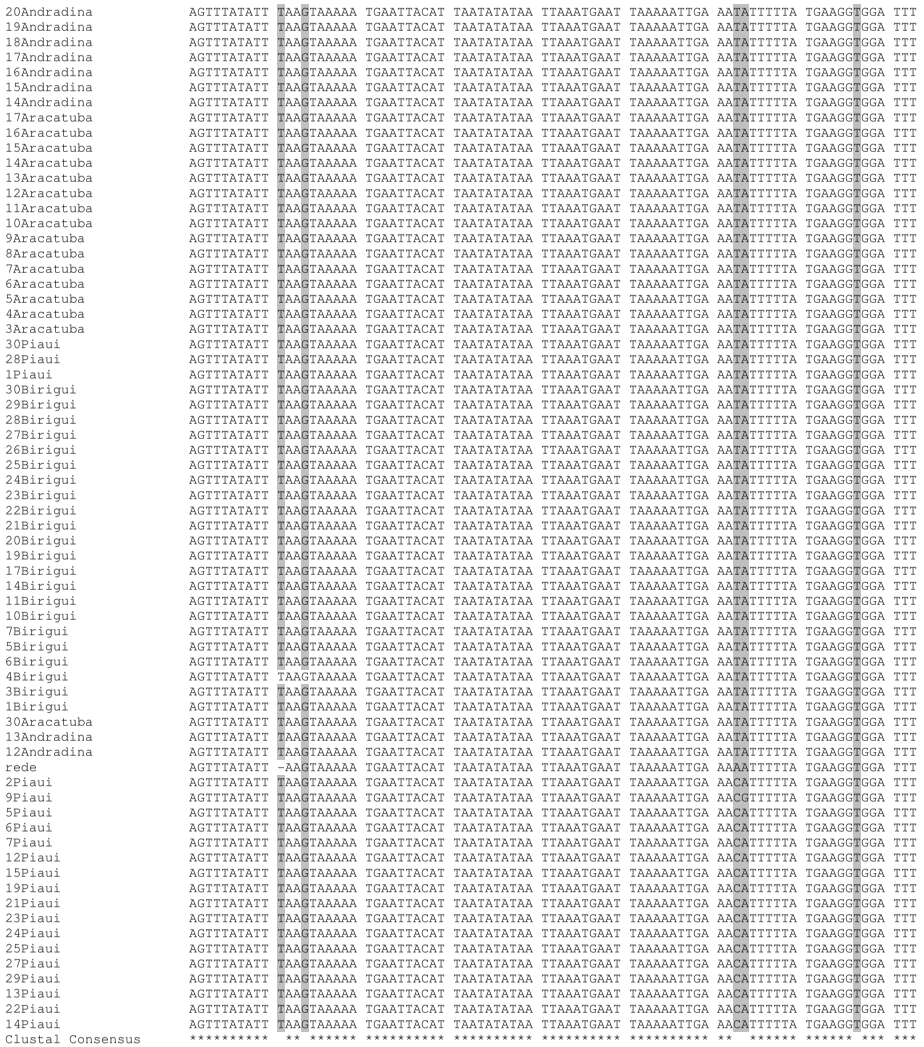


Figura 10: Alinhamento das seqüências obtidas até o presente momento, realizado através do programa *CLUSTAL X (1.81)*.

Os sítios polimórficos estão assinaladso em cinza.

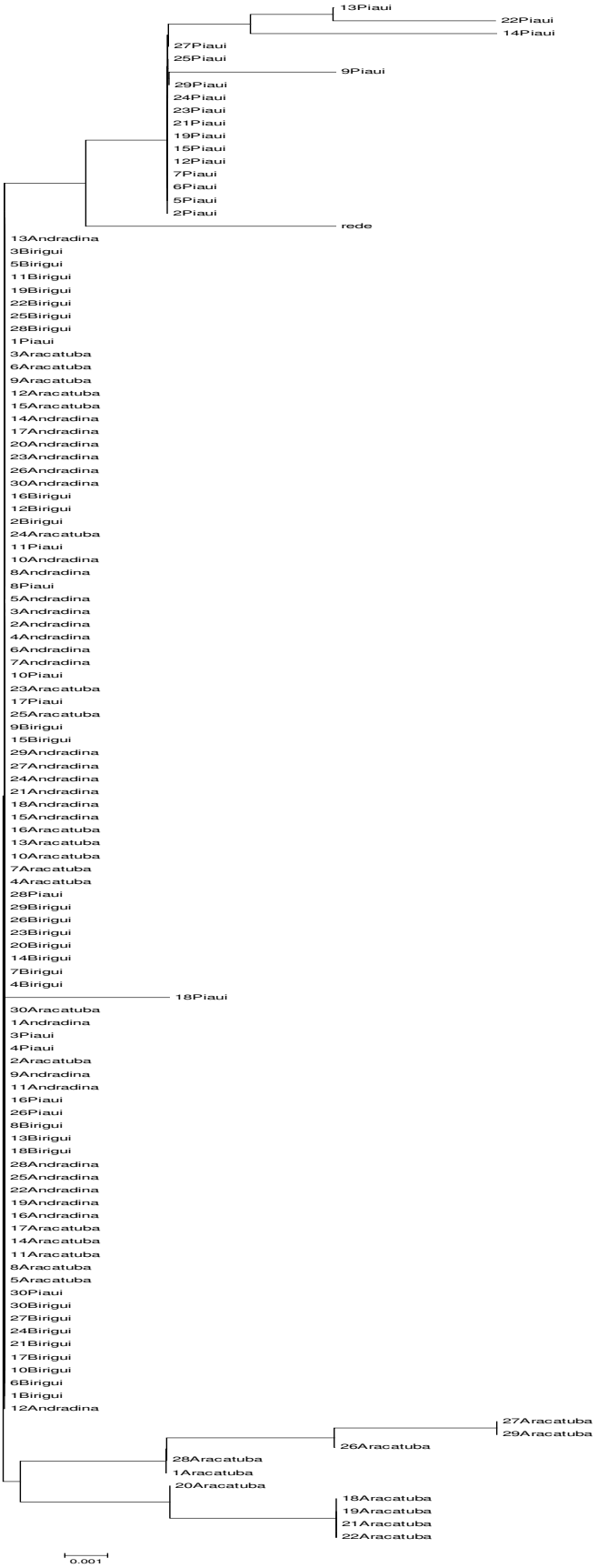


Figura 11: Árvore filogenética confeccionada pelo software MEGA 3.1, utilizando como parâmetro Neighbor-Joining para a sua construção.

Os dados obtidos através da analise dos haplótipos podem ser observados nas tabelas 1 e 2. A tabela 1 representa os 12 haplótipos e seus respectivos sítios onde ocorreram os polimorfismos. Como pode ser observado na tabela, a maioria dos haplótipos esta representada por apenas 1 individuo. Os haplótipos 1 e 7 são os que mais representativos e diferem entre si por apenas um sítio polimórfico (posição 243). Interessante notar que esta mutação esta presente nos haplótipos H7, H8, H9, H10 e H12, todos de indivíduos provenientes de Teresina.

Já na tabela 2 encontram se os dados referentes a cada população tais como: número de haplótipos encontrados dentro de cada população (h), a taxa de diversidade destes haplótipos para cada população (Hd), a média das diversidades observadas dentro de cada população (K) e por fim a taxa de diversidade de nucleotídeos dentro de cada uma delas (Pi). A última coluna é referente aos valores totais, ou seja, os valores do N total que é igual a 120 indivíduos. As populações de Birigui e Andradina, por apresentarem apenas 1 haplótipo, não possuem diversidade em nenhum nível analisado. Apesar da população de Teresina apresentar maior número de haplótipos e, portanto, maior diversidade haplotípica, em Araçatuba são encontrados os maiores níveis de diversidade genética. Entretanto estas diferenças entre Teresina e Araçatuba são muito pequenas.

Um mapa dos 12 haplótipos foi construído e está apresentado na Figura 12. Podemos observar por este mapa que grande parte dos indivíduos (91%) apresentou um haplótipo (H1). Todas as conecções entre os haplótipos representam apenas um passo mutacional. Os haplótipos derivados de H1 podem ser divididos em 2 grupos, um com indivíduos apenas de Teresina (H7 a H12) e outro grupo com indivíduos de Araçatuba (H2 a H6).

Tabela 1: Sítios polimórficos e suas respectivas posições e total de indivíduos estes polimorfismos:

Haplótipos										**Total de indivíduos**
1	C	C	C	C	T	G	T	A	T	91
2	T	●	●	●	●	●	●	●	●	2
3	●	●	●	●	G	●	●	●	G	4
4	●	●	●	●	G	●	●	●	G	1
5	●	●	●	●	●	●	●	●	G	1
6	T	●	T	●	●	●	●	●	G	2
7	●	●	●	●	●	●	C	●	●	13
8	●	●	●	●	●	●	C	G	●	1
9	●	●	●	T	●	●	C	●	●	1
10	●	T	T	●	●	●	C	●	●	1
11	●	●	●	●	●	A	●	●	●	1
12	●	●	T	T	●	●	C	●	●	1
Posição dos sítios variáveis	36	80	84	107	178	194	243	244	257	

Tabela 2: Valores de diferenciação genética calculados através do programa DnaSP Ver.4.10.9:

	Andradina	Araçatuba	Birigui	Teresina	Total
Nº de haplótipos (h)	1	6	1	7	12
Diversidade haplótipica (Hd)	0,00000	0,54483	0,00000	0,66437	0,41261
Média das diferenças (K)	0,00000	1,07356	0,00000	0,95402	0,67703
Diversidade de nucleotídeos (Pi)	0,00000	0,00408	0,00000	0,00364	0,00257

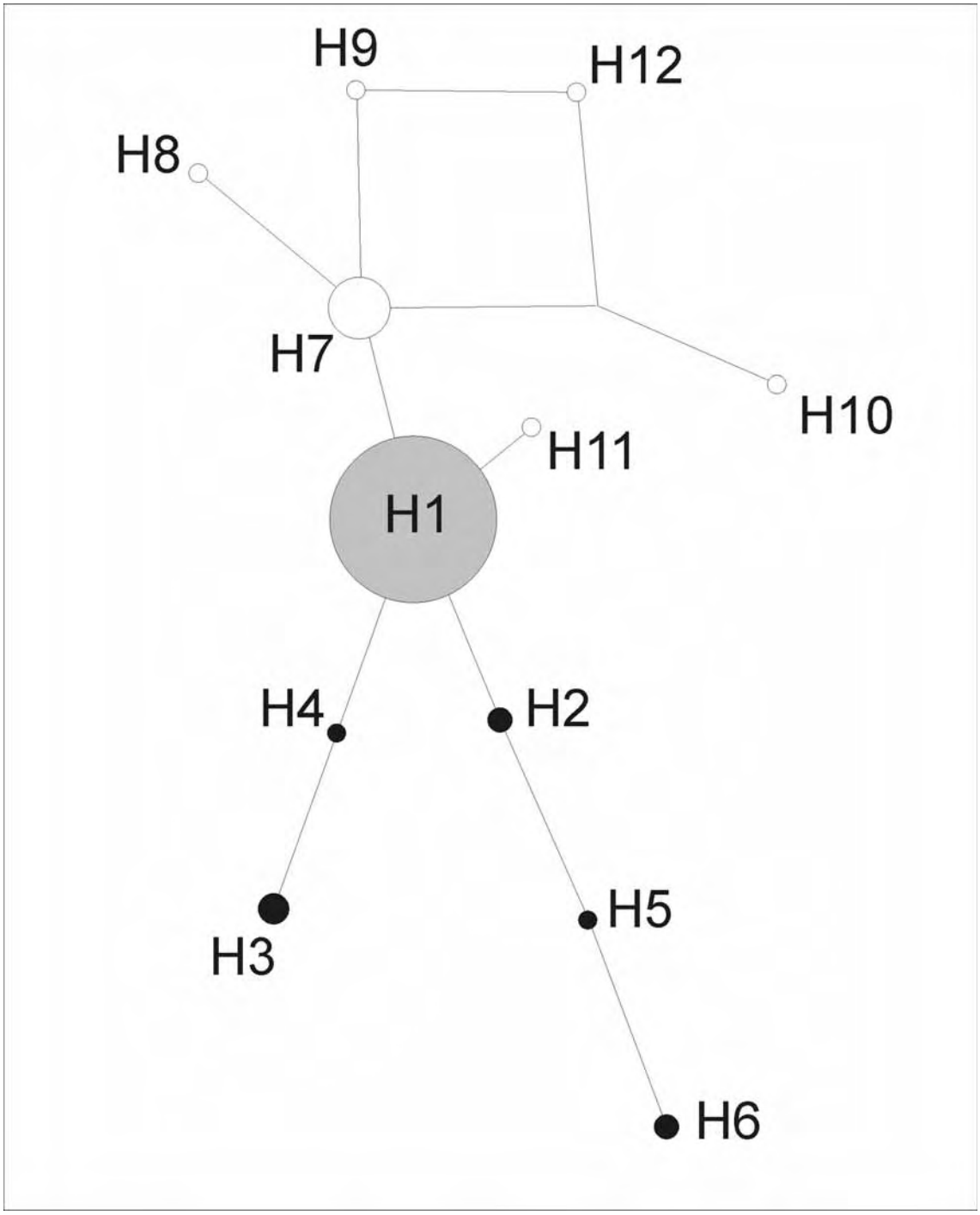


Figura 12: Árvore confeccionada a partir dos dados de haplótipos citados na tabela 1.
○ Indivíduos de Teresina
● Indivíduos de todas as populações, predominantemente Andradina e Birigui
● Indivíduos de Araçatuba

6. DISCUSSÃO

Foram amplificados e seqüenciados parte do gene mitocondrial referente à partícula ribossomal 12S de 120 indivíduos a espécie *Lutzomyia longipalpis*, coletados em 4 diferentes cidades: Andradina, Araçatuba e Birigui, todas estas cidades do estado de São Paulo e uma população de Teresina, estado do Piauí (Figura 8).

Até o momento, não foi possível a amplificação do gene ribossomal nuclear 28S das amostras de *Lutzomyia longipalpis* do Brasil. Apesar deste gene já ter sido utilizado em estudos de genética populacional de amostras do Peru e Colômbia BEATI *et al*. (2003), as mesmas condições de amplificação não resultaram em produto detectável das amostras brasileiras até o momento. Esta não amplificação pode significar diferenças no DNA ribossomal das espécies estudadas por BEATI *et al*. (2003) em relação aos espécimes coletados no Brasil, demonstrando um possível isolamento entre estas duas populações, suficiente para gerar estas diferenças.

Por outro lado, os oligonucleotídeos iniciadores T1B e T2A descritos no mesmo trabalho (BEATI *et al*. (2003)) referentes ao fragmento 12S rDNA mitocondrial foram utilizados na reação de PCR gerando um produto de aproximadamente 360pb como os ilustrados na Figura 9.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA mostraram a presença de polimorfismos em diferentes posições neste fragmento (Figura 10). Observou–se um SNP (*single nucleotide polymorphism*) em todas as 120 seqüências analisadas *(-AATCC**C**CGTT-)* quando submetidas à comparação com a seqüência depositada no GENBANK *(-AATCC**T**CGTT-)* proveniente de espécime coletada na Colômbia (120:1 indivíduos). Este pode ser outro indicativo de isolamento destas duas populações. Além deste SNP, foi observada uma deleção na seqüência de *L. longipalpis* da Colômbia e Peru, quando comparada com as 120 sequências obtidas no Brasil. Uma vez que este gene não é traduzido, deleções ou inserções podem ocorrer desde que não modifiquem drasticamente a estrutura terciária do RNA transcrito.

Outro polimorfismo apresentou 3 diferentes alelos, um presente no isolado por BEATI *et al*. (2003) *(-TTGAAA**A**ATTT-),* um presente na maioria dos indivíduos analisados do Brasil *(-TTGAAA**T**ATTT-)* e outro presente em 17 indivíduos de Teresina *(-TTGAAA**C**ATTT-).* (1:103:17)

Estas diferenças indicam que as populações do Brasil podem ser distintas de outras populações de *Lutzomyia longipalpis* encontradas na América do Sul. Além disto, parece que dentro do Brasil, a população do Nordeste possui certo isolamento das populações do Estado de São Paulo, o que pode ter levado a uma divergência genética entre elas. Foram observados também dois polimorfismos que diferenciam indivíduos da população de Araçatuba, a primeira consiste na região *(-TAGTT**T**ATTC-)* na quais 5 indivíduos (25:5) de Araçatuba apresentaram o polimorfismo: *(-TAGTT**C**ATTC-).* A segunda região *(–GAAGG**T**GGATTT-)* apresentou diferença em 7 indivíduos (23:7) *(–GAAGG**G**GGATTT-).*

A cidade de Araçatuba representa um ponto importante no histórico da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, devido ao fato de ter sido o primeiro foco registrado da doença no Estado (CAMARGO-NEVES & KARTZ 1999, GALIMBERTTI et al. 1999).

Quando construída a árvore filogenética (Figura 11), a partir destas seqüências do segmento 12S rDNA mitocondrial, observa se que há grande similaridade entre os indivíduos, já que se trata de um segmento de gene conservado, porém construíram-se dois ramos bem definidos, um agrupamento de 17 indivíduos da população de Piauí mais próximos a seqüência depositada no GENBANK e o outro formado por 10 indivíduos de Araçatuba, devido aos SNPs já citados anteriormente. Ainda que se trate de diferenças genéticas muito sutis, porém não menos interessantes, estas podem servir como base para estudos mais aprofundados com marcadores mais polimórficos que comprovem se realmente já existam grandes divergências entre populações do Brasil.

Outro resultado curioso foi a semelhança revelada entre as populações de Andradina e Birigui, já que esta última cidade encontra-se geograficamente muito mais próxima de Araçatuba, como podemos observar na figura 8, e a cidade de Andradina encontra-se bem próxima a fronteira do estado de São Paulo com o estado de Mato Grosso do Sul. Acreditamos que uma explicação para este fato seja devido a maior densidade demográfica da cidade de Araçatuba, 169.303 habitantes, possuir uma infra-estrutura melhor o que atrai pessoas de diferentes localidades e por estar localizada na rota rodoviária que liga o estado de São Paulo ao estado de Mato Grosso do Sul, o que nos leva a supor que a população de insetos de Araçatuba entre em contato mais facilmente com outras populações de fora, levando a uma maior diversidade genética em relação a Andradina e Birigui, que são cidades menores, 54.824 e 94.685 habitantes respectivamente.

Encontramos 12 haplótipos entre as populações, e ao avaliarmos mais detalhadamente estes haplótipos encontrados (Tabela 1 e 2), podemos observar que as seqüências realmente são bastante homogêneas quanto a sua composição, especialmente as populações de Andradina e Birigui, onde não foram observados polimorfismos. Encontramos nas populações de Araçatuba e Teresina polimorfismos significativos sendo 6 haplótipos observados em Araçatuba e 7 em Teresina.

Como podemos observar na figura 12, os haplótipos que forneceram dados interessantes foram: para Araçatuba: H2= 2 indivíduos, H3=2 indivíduos e H6=4 indivíduos e para Teresina: H7, 13 indivíduos, dados que reproduzem no diagrama de haplótipos dois ramos bem definidos para estas populações destacando os polimorfismos observados entre as populações analisadas. Dados que nos leva a supor que realmente já exista uma diferenciação entre as populações do nordeste do país e as populações presentes no estado de São Paulo. Já o haplótipo H1=91 indivíduos que inclui alguns espécimes das 4 populações estudadas e todos os indivíduos de Andradina e Birigui, revela uma uniformidade entre as populações, onde se encontram a maior parte dos indivíduos agrupados.

Quanto aos valores de Diversidade haplótipica (Hd), Diversidade de nucleotídeos (Pi) e Média das diferenças (K) obtidos na Tabela 2, não é possível afirmar através deles se estes polimorfismos realmente são relevantes, pois não encontramos trabalhos sobre os haplótipos dentro da espécie *Lutzomyia longipalpis.* Apenas é possível afirmar que a população de Araçatuba, apesar de possuir um número menor de haplótipos, possui uma maior diversidade de nucleotídeos e um K, maior em relação à população de Teresina, podemos portanto apenas afirmar que a população de Araçatuba é mais polimórfica que a de Teresina, fato que possivelmente se deva ao intenso fluxo de pessoas que ocorre nesta cidade que é uma importante ligação entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Desde o primeiro artigo relatando a possibilidade de *Lu. longipalpis* ser um complexo de espécies MANGABEIRA (1969) alguns estudos vem sido realizados a fim de esclarecer este ponto. Como podemos observar na revisão de BAUZER (2007) a maioria destes trabalhos concluíram que realmente trata-se de um complexo de espécies. Porém, assim como está muito bem destacado na conclusão de MAINGON (2007), para que se esclareça essa incógnita é necessária a união de diferentes áreas, pois se trata de uma questão multidisciplinar. Os dados presentes neste trabalho indicam, que pelo menos para as populações analisadas, não possuímos grandes divergências que indiquem a ocorrência de espécies crípticas. Apesar disso, temos que tratar estes resultados com ressalva visto dois fatores: um pequeno número de populações foram analisadas, principalmente do Nordeste, onde apenas uma população foi avaliada; além disso, o marcador utilizado neste trabalho consiste de um gene mitocondrial, ou seja, um gene de origem materna no qual não ocorre recombinação. Mesmo levando em conta estes dois fatores, pudemos observar um grau de polimorfismo que indica que estas populações compreendem um ramo monofilético que representam uma espécie, *Lutzomyia longipalpis*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados presentes neste trabalho indicam, que pelo menos para as populações analisadas, não possuímos grandes divergências que indiquem a ocorrência de espécies crípticas. O grau de polimorfismo observado indica que estas populações compreendem um ramo monofilético que representam uma espécie: *Lutzomyia longipalpis*.

Apesar destes polimorfismos não terem ocorrido em um número consistente de indivíduos e para variações intra-especificas este talvez não seja o melhor marcador molecular, estes dados são relevantes; pois, trata-se um gene mitocondrial, ou seja, um gene de origem materna, portanto, permite analises de linhagens históricas e também se trata de um segmento conservado, o que leva a supor que realmente exista divergência entre as populações. Esses dados podem servir de base

para estudos com outros marcadores moleculares, de regiões com maiores taxas de polimorfismos; pois os estudos genéticos sobre a espécie *Lutzomyia longipalpis* ainda são recentes e em pequeno número, e a doença tem sido notificada em números crescentes anualmente, portanto ainda é um importante campo de estudo a ser explorado.

Para que se esclareça se *Lutzomyia longipalpis* trata-se realmente de um complexo de espécies é necessária a união de diferentes áreas, pois se trata de uma questão multidisciplinar (Maigon *et al*., 2007)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARRIVILLAGA, J.C., FELICIANGELI, M.D. Larval morphological differentiation between pppulations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Venezuela (Díptera: Psychodidae). **Bol Entomol Venez.** 15: 229-234, 2000.

2. ARRIVILLAGA, J.C., FELICIANGELI, M.D. *Lutzomyia pseudolongipalpis:* the first new species witin the l*ongipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Riconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. **J Med Entomol.** 38: 783-790, 2001.

3. ARRIVILLAGA, J.C., NORRIS, D.E., FELICIANGELI, M.D., LANZARO, G.C. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infection, Genetic and Evolution 2,** p: 83-95, 2002.

4. BAUZER, L. G. S. R., SOUZA, N.A., WARD, R. D., KYRIACOU, C. P. PEIXOTO, A.A. The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Molecular Biology**, v.11 (4): p. 315-323, 2002.

5. BAUZER, L.G.S.R., SOUZA, N.A., MAIGON, R.D.C., PEIXOTO, A.A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102 (1): p.1-12, 2007.

6. BEATI, L and KEIRANS, J. E., Analysis of the systematic relationships among ticks of de genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari:Ixodidae) based on the mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **J. Parasitol***.,* v. 87(1), 2001, p. 32–48

7. BEATI, L., CÁRCERES, A.G., LEE, J.A., MUNSTERMANN, L.E. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S end 28S ribosomal DNA sequences. **International Journal for Parasitology, v**. 34, 2004, p.225-234.

8. BOROVISKY (1898) apud ____ RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M.N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova** v. 26(4): p. 550-555, 2003.

9. CAMARGO-NEVES, VLF de, KATZ, G. Leishmaniose visceral americanas no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. de Méd. Tropical** v. 32 (Supl.II): p.63-64, 1999.

10. CAMARGO - NEVES, V.L.F., GLASSER, C.M., CRUZ, L.L., ALMEIDA, R.G. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. **Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controles de Endemias e Coordenadoria de Controles de Saúde.** São Paulo, 2006.

11. CUNHA, A. M. & CHAGAS, E.1937. Nova espécie de protozoário do Gênero Leishmania pathogênico para o homem (nota prévia). **O Hospital** vol. XI (2): 5-9.

12. CUNNINGHAM (1885) apud ____ RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M.N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova** v. 26(4): p. 550-555, 2003.

13. DEPAQUIT, J. FERTÉ, H., LÉGER, N., KILLICK-KENDRICK, R., RIOUX, J. A., KILLICK-KENDRICK, M., HANAFI, H. A., GOBERT, S. Molecular systematics of the Phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS 2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. **Insect Molecular Biology**, v 9 (3): p. 293-300, 2000.

14. DEPAQUIT, J., FERTÉ, H., LÉGER, N., LEFRANC, F., ALVES-PIRES, C., HANAFI, H., MAROLI, M.., MORILLAS-MARQUEZ, F., RIOUX, J-A., SVOBODOVA, M., VOLF, P. ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. **International Journal for Parasitology**, v. 32: p. 1123-1131, 2002.

15. DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14: p. 417-423, 1996.

16. DIAS, E. S., FORTES-DIAS, C. L., STITELER, J. M., PERKINS P. V., LAWYER, P. G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40: p. 49-53, 1998.

17. DONOVAN, C. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia. **BMJ**, v. 2: p. 79, 1903.

18. EOM, K. S., JEON, H-K., KONG, Y., HWANG, U. W., YANG, Y., LI, X., XU, L., FENG, Z., PAWLOWSKI, Z. S., RIM, H.-J. Identification of *Taenia asiática* in China: molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. **Journal Parasitology**, v. 88(4): p. 758-764, 2002.

19. EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8: p. 186-194, 1998.

20. FORATTINI, O.; RABELLO, E. X. & PATTOLI, D. G. B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) no estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.,** v. 4(1): 99- 100, 1970.

21. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas. Ministério da Saúde. Brasília, 2003.

22. GALATI, E.A.B. Phylogenetic systematics of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. (*II Intern. Symp. Phlebotominae Sandflies*). *Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb*. 35 (supl. 1): 133-142, 2003.

23. GALATI, EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro., Fiocruz. pg. 55, 2003.

24. GALIMBERTI, M.Z., KATZ, G., CAMARGO-NEVES, V.L. F de, RODAS, L.A.C., CASANOVA, C., COSTA, I.P., ARAÚJO, M.F.L., TANIGUCHI, H.H., BARBOSA, J.A.R., BARBOSA, J.R.E., TOLEZANO, J.E., PINTO, P.L.S. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 32: p.217-218, 1999.

25. GENARO, O & MICHALICK, M. S. M. Leishmaniose visceral americana. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Editora Ateneu. 11ª ed.cap. 10, p. 67-83, 2005.

26. GRIMALDI, G. Jr., & TESH, R. B. L. Leishmaniases of the new World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiol Review**, v. 6: 230-250, 1993.

27. HODGKINSON, V. H., BIRUNGI, J., HAGHPANAH, M., JOSHI, S., MUNSTERMANN, L. E. Rapid identification of mitochondrial cytochrome B haplotypes by single strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidade) populations. **Journal of Medicine Entomology**, v. 39(4): p. 689-694, 2002.

28. KAMPEN, H., STERNBERG, A., PROFT, J., BASTIAN, S., SCHAFFNER, F., MAIER, W., SEITZ, H. M. Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger ss* and *Anopheles petragnani* (Diptera: Culicidae). **American Journal Tropica Medicine Hygiene**, v. 69(2): p. 195-199, 2003.

29. LAINSON R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. **In The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Academic Press Inc., London 1: p. 1-120, 1987.

30. LANZARO, G. C., OSTROVSKA, K., HERRERO, M. V., LAWYER, P. G., WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **Am J Trop Med Hyg**. 49:839-847.

31. **American Journal Tropical Medicine Hygiene,** v. 48: p. 839-847, 1993.

32. LASVERAN & MESNIL (1903) apud ____ RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M.N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova** v. 26(4): p. 550-555, 2003.

33. LEISHMAN, W. B. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia. **BMJ**, v. 2: p. 79, 1903.

34. LUTZ, A., NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4: p. 84-95, 1912.

35. MAINGON, R. D. C., WARD, R. D., HAMILTON, J. G. C., NOYES, H. A., SOUZA, N., KEMP, S. J., WATTS, P. C. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidade) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. **Molecular Ecology,** v. 12 (7): p. 1879 – 1894, 2003.

36. MAINGON, R. D. C., WARD, R. D., HAMILTON, BAUZER, L.G.S.R., PEIXOTO, A.A., The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? **TRENDS in Parasitology,** v.24 (1): p.12-16.

37. MANGABEIRA, O. Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. **Ver Brás Mal Doen Trop**, v. 21: p. 3-26, 1969.

38. MARFURT, J., NIEDERWIESER, I., MAKIA, N. D., BECK, H-P., FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 46: p. 115-124, 2003.

39. MUKHOPADHYAY, J., GHOSH, K., BRAIG, H. R. Identification of cutaneous Leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. **Acta Tropica** v. 76: p. 277-283, 2000.

40. PALUMBI S. R. PCR and molecular systematics. **Molecular Systematics**, 2 ed.: p. 205-247, 1996.

41. PEIXOTO, A. A., GOMES, C. A., AMORETTY, P. R., LINS, R. M. M. A., MEIRELES-FILHO, A. C. A., SOUZA, N. A., KYRIACOU, C. P. New molecular markers for phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology** v. 31: p. 635-639, 2001.

42. PENNA, H. A., 1934. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, 48: 949-950.

43. RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M.N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova** v. 26(4): p. 550-555, 2003.

44. REFSETH, U. H., FANGAN, B. M., JAKOBSEN, K. S. Hybridization capture of microsatéllites directly from genomic DNA. **Electrophoresis**, v. 18: 1519 – 1523, 1997.

45. ROGERS, L (1904) Preliminary note on the development of *Trypanossoma* in cultures of Cunningham-Leshman-Donovan bodies of cachexial fever and kala-azar. **Lancet** 2:215-216.

46. ROSS (1903) apud ____ RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D. M., JESUS, M.N., MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova** v. 26(4): p. 550-555, 2003.

47. ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. Primer 3. Code available at http:// **www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html**

48. SOTO, S.I.; LEHMANN, T.; ROWTON, E.D.,; VELEZ, B.I.D.; PORTER, C.H. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from mitochondrial ND4 gene. **Mol Phylogen Evol.** 18: 84-93.

49. SWOFFORD, D. L. **PAUP – Phylogenetic analysis using parsimony**, Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2000.

50. THOMPSON, J. D. GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25: p. 4876-4882, 1997.

51. TOLEZANO, J. E., TANIGUCHI, H. H., ELIAS, C. R., LAROSA, R. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60(1): p. 47-51, 2001.

52. URIBE, S. The status of the Lutzomyia longipalpis species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94(6): p. 729-734, 1999.

53. WARD, R.D.; RIBEIRO, A.L.; READY, P.R., MURTAGH, A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera:Psychodidade), the vector of *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas) and its significance to kala-azar distribuition in South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 78:269-280. 1983

54. WARD, R.D.; PHILLIPS, A.; BRUNET, B.; MARCONDES, C.B.. The *Lutzomyia longipalpis* complex and distribution. In MW Service, **Biosystematics of Haematophagous Insects,** Oxford University Press, Oxford, p.258-269, 1988.

55. WATTS, P. C., BOYLAND, E., NOYES, H. A., MAINGON, R., KEMP, S. J. Polymorphic dinucleotide microsatellite loci in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). **Molecular Ecology Notes**, v. 2: p. 62-64, 2002.

56. WEST, D. F., PAYETTE, T., MUNDY, T., BLACK, W. C. Regional molecular genetic key of thirteen snow pool *Aedes* species (Diptera: Culicidae) in northern Colorado. **Journal of Medical Entomology**, v. 34(4): p. 404 – 410, 1997.

57. WILIAMS, P & DIAS, E. S. Psychodidae. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Editora Ateneu. 11ª ed. Cap. 42, p. 345 - 353, 2005.

58. WHO/OMS – World Health Organization/ Organisation Mondiale de La Santé. Disease and its impact. Geographical distribution. Disponível em: **htt://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html** Acessado em: 25/09/03.