

ANDRÉ LUIZ GONÇALVES

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA:PSYCHODIDAE) COM ÊNFASE AO COMPLEXO *Lutzomyia*  
*intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912), NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA, ÁREA  
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - área de Concentração de Parasitologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA  
2010

ANDRÉ LUIZ GONÇALVES

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE FLEBOTOMÍNEOS  
(DIPTERA:PSYCHODIDAE) COM ÊNFASE AO COMPLEXO *Lutzomyia*  
*intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912), NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA, ÁREA  
ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ESTADO DO  
PARANÁ, BRASIL.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - área de Concentração de Parasitologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA  
2010

## Termo de aprovação

## AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro, pela orientação, compreensão, paciência, e por ter aberto caminho para a execução da pesquisa científica.

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Débora do Rocio Klisiowicz, pelo incentivo e disposição sempre constantes para a construção deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol, pelo apoio técnico e pessoal, e pelas ações que foram fundamentais na elaboração deste estudo.

Ao Dr. Ênnio Luz, pela colaboração, amizade e ensinamentos incontestes.

Aos meus pais, Alezandro Pinheiro Gonçalves e Arlete Terezinha Bombazar, por todo o apoio possível.

Aos Professores e colegas do Departamento de Patologia Básica e do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, em especial: Dr<sup>a</sup>. Adriana Oliveira Costa, Dr<sup>a</sup>. Rosângela Clara Paulino e a Dr<sup>a</sup>. Ana Leuch Lozovei.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, especialmente aos que contribuíram nos trabalhos de campo: Guilherme Garcia, Tatiana Louise Gazda e André Luiz de Almeida Melo.

À Dr<sup>a</sup>. Magda Costa Ribeiro, pelos subsídios para a extração de DNA dos flebotomíneos.

À Dr<sup>a</sup>. Larissa Reifur, pela revisão do abstract.

Aos moradores de Cerro Azul e Adrianópolis, que também colaboraram para com este trabalho, autorizando nossa permanência em suas propriedades para que pudéssemos capturar os insetos e sempre nos auxiliando.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À banca examinadora, pelas significativas sugestões para com esta dissertação.

O aperfeiçoamento técnico-científico num país que apresenta grande demanda pelos avanços da Ciência traduz-se em oportunidade que deve ser valorizada. Demonstro aqui minha gratidão especial aos Professores Edilene Alcântara de Castro, Vanete Thomaz Soccol, Ênnio Luz e Débora do Rocio Klisiowicz, por toda a construção ao longo deste período.

## RESUMO

*Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) é considerado como um dos vetores do protozoário *Leishmania (Viannia) braziliensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Paraná. Neste estado, uma das áreas de transmissão da doença é o Vale do Rio Ribeira, onde *L. intermedia* encontra-se de modo prevalente. Este flebotomíneo é entendido por alguns autores como sendo um complexo de espécies crípticas, onde a diferenciação entre os dois grupos (linhagens) que formam o complexo é feita morfológicamente. Assim, procurou-se determinar o nível de variabilidade fenotípica e genotípica desta comunidade de flebotomíneos no Vale do Ribeira paranaense, com ênfase no Complexo *L. intermedia*. Procurou-se também detectar o protozoário *Leishmania* nas fêmeas capturadas. Para ambos os objetivos, coletas foram realizadas, nos municípios de Cerro Azul e Adrianópolis, em diferentes ambientes (domicílio, peridomicílio e mata). Após as capturas, os insetos foram dissecados, identificados e separados por espécie. Utilizando armadilhas CDC, 432 espécimes foram coletados (304 machos e 128 fêmeas). As duas linhagens de *L. intermedia* foram encontradas nos dois municípios, e pelo menos mais três espécies (*Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia pessoai* e *Lutzomyia migonei*) compõem a fauna flebotomínica na região. Para avaliar a variabilidade genética, o DNA dos flebotomíneos do Complexo *L. intermedia* e das outras quatro espécies foi extraído e submetido ao RAPD (Amplificação Randômica de DNA), com o uso de quatro iniciadores (A2, A3, A9 e A10). Os dendrogramas gerados demonstraram variados graus de similaridade, com o “primer” A10 indicando existência de fluxo gênico entre as populações estudadas. O “primer” A2 foi útil em agregar os espécimes do Complexo *L. intermedia* de acordo com a sua origem bio-geográfica, e os “primers” A3 e A9 sinalizaram ser possíveis marcadores espécie-específico ou ecótopo-específicos. A análise através do RAPD também uniu num mesmo agrupamento as duas linhagens de *L. intermedia*, o que apóia a existência de uma única espécie neste grupo. A grande diversidade genotípica em *L. intermedia*, aliada à sua alta prevalência (93,28%) nas coletas realizadas, incluindo os domicílios, corrobora o caráter antropofílico desta espécie, e o provável status de vetor de *Leishmania* na região, apesar de até o presente não ter sido isolado o protozoário de nenhuma fêmea.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. Vale do Ribeira. Paraná. *Lutzomyia intermedia*. RAPD.

## ABSTRACT

*Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) is considered a proven vector of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, the etiological agent of American Cutaneous Leishmaniasis in Paraná. In this state, there are several areas where disease transmission occurs, including the Ribeira River Valley where concentration of *L. intermedia* is observed. This sand fly is considered by some authors as a complex of cryptic species divided in two groups (lines) that can be differentiated upon examination of subtle morphological features. We sought to determine the level of variability in the phenotype and genotype of the sand fly fauna from the Ribeira valley, emphasising *L. intermedia* complex. We also sought to determine the *Leishmania* infection in females. Insect collections were made in the districts of Cerro Azul and Adrianópolis, in different ecotopes (inside of houses, peridomiliary areas, and forest). The insects were dissected, identified, and sorted by species. Using CDC, we collected a total of 432 specimens (304 males and 128 females). The two lines of *L. intermedia* were found in two municipalities, as well as, three other species (*Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia pessoai*, and *Lutzomyia migonei*). The DNA of sand flies was subjected to RAPD (Random Amplification of DNA), using primers A2, A3, A9 and A10. Using primer A10, the resulting dendrograms showed varying degrees of similarity between sand flies, possibly indicating the existence of gene flow among the populations. The primer A2 classified the *L. intermedia* lines according to their bio-geographical origin. On other hand, primers A3 and A9 were species-specific and site-specific markers. Our RAPD analysis also detected the two lines of *L. intermedia*, which supports the existence of a single species within this group. Despite the fact that *Leishmania* has never been isolated from a female *L. intermedia*, the genotypic diversity, combined with its high prevalence (93.28%) in the household, confirms the anthropophilic character of *L. intermedia*, and its status as a potential vector of *Leishmania* in the region.

Key words: American Cutaneous Leishmaniasis. Ribeira River Valley. Paraná. *Lutzomyia intermedia*. RAPD.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
3.1 O PROTOZOÁRIO <i>Leishmania</i> .....	13
3.2 AS LEISHMANIOSES .....	16
3.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana .....	17
3.2.1.1 Leishmaniose Cutânea .....	18
3.2.1.2 Leishmaniose Mucocutânea .....	19
3.2.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa .....	20
3.2.2 Leishmaniose Visceral .....	20
3.3 <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> (LUTZ & NEIVA, 1912) .....	21
3.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	27
3.5 ESTUDOS GENÉTICOS DE FLEBOTOMÍNEOS .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Descrição da área de estudo .....	35
4.2 Métodos de captura dos flebotomíneos .....	37
4.3 Procedimentos de Laboratório .....	39
4.3.1 Identificação morfológica dos flebotomíneos .....	39
4.3.2 Isolamento de <i>Leishmania</i> em intestino de flebotomíneos .....	40
4.3.3 Cultivo dos protozoários .....	41
4.3.3.1 Cultura <i>in vitro</i> .....	41
4.3.4 Extração de DNA .....	41
4.3.5 Amplificação Randômica de DNA (RAPD-PCR) .....	41
4.3.5.1 Determinação dos iniciadores para RAPD .....	41
4.3.5.2 Amplificação .....	42
4.3.5.3 Eletroforese .....	43
4.3.6 Análise Fenética .....	43
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
5.1 FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS .....	45

5.2 PESQUISA DE <i>Leishmania</i> NAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS .....	48
5.3 <i>Lutzomyia intermedia</i> s.s. X <i>Lutzomyia neivai</i> .....	48
5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO .....	49
5.4.1 Análise fenética pelos “primers” A10 e A2.....	56
5.4.2 Análise pelos “primers” A3 e A9 .....	60
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>77</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>78</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é causada por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Metakinetoplastina:Trypanosomatida), que no Novo Mundo são transmitidos para os humanos através do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de dípteros do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae:Phlebotominae) (YOUNG & DUNCAN, 1994; PETERSON & SHAW, 2003; ADL *et al.*, 2005). No Paraná, uma das áreas de transmissão da doença é a região do Vale do Rio Ribeira, situada ao nordeste deste Estado (CASTRO, 2001).

A competência de uma espécie de flebotomíneo, de ser infectada e de se transformar em vetor, depende de vários fatores intrínsecos que determinarão a sua capacidade de ser susceptível ou refratário ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania*. Esses fatores sugerem a existência de um processo de co-evolução entre as distintas espécies de *Leishmania* com os seus flebotomíneos vetores (PIMENTA *et al.*, 2003; KAMHAWI, 2006). KILLICK-KENDRICK (1999), assinala que a maioria das espécies de flebotomíneos não desempenha qualquer papel na transmissão de *Leishmania*, por uma série de razões: não sugarem o sangue humano, sua distribuição poder ser diferente daquela do hospedeiro reservatório, suas preferências alimentares não incluírem estes hospedeiros, ou ainda, pelo fato dos insetos serem incapazes de permitir o desenvolvimento dos parasitas.

O táxon *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) que é aceito como um complexo de espécies crípticas (MARCONDES, 1997), é a população predominante no Vale do Ribeira, sendo encontrada tanto no litoral como no interior e distribuída até o Pará como limite setentrional, no Brasil, e Norte da Argentina e o Paraguai. Habita florestas primitivas e de segunda formação. Tem sido capturada no interior de cidades, bastando a proximidade de vegetação densa para reproduzir-se (GOMES *et al.*, 1986; RANGEL & LAINSON, 2003; SANTOS *et al.*, 2009).

Em áreas endêmicas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911, MARCONDES (1997) redescreve *L. (N.) neivai* (Pinto, 1926) como espécie

distinta de *L. intermedia*, utilizando critérios morfológicos da espermateca e seus ductos e dentes do cibário de fêmeas. A relação entre as dimensões da estrutura genital e extragenital foi utilizada na distinção de machos de *L. intermedia s.s.*<sup>1</sup> e *L. neivai*. Além de dados morfométricos, este autor utilizou DNA mitocondrial e como resultado reconheceu duas linhagens filogenéticas de *L. intermedia s.l.*<sup>2</sup> - *L. intermedia s.s.* e *L. neivai*.

No Vale do Ribeira, a espécie *L. intermedia s.l.* pela alta densidade é considerada responsável pela transmissão de *L. braziliensis*. (FORATTINI, 1976; GOMES & GALATI, 1989; CASTRO *et al.*, 2005). No entanto, em algumas áreas desta região, as pesquisas envolvendo a epidemiologia da leishmaniose ainda são incipientes e carentes de mais dados que possam servir de subsídio para as estratégias a serem tomadas pelos serviços de saúde pública.

De acordo com READY *et al.* (1984), problemas referentes à identificação, principalmente os associados aos complexos de espécies, têm dificultado a investigação do ciclo de transmissão de *L. braziliensis*. Dados moleculares, entretanto, podem conter variação suficiente para auxiliar nestas questões, revelando variações entre populações de diferentes áreas geográficas que não distinguíveis pela morfologia, assim como as que constituem complexos de espécies (AVISE, 1994). Uma das técnicas que facilitou a resolução de problemas de taxonomia em diversos grupos animais foi o RAPD-PCR (Amplificação Randômica – Reação em Cadeia da Polimerase), por ser precisa e de rápida execução (COLLINS *et al.* 1987).

Algumas questões surgem diante das informações até o momento estudadas: estariam *L. intermedia s.s.* e *L. neivai* ocorrendo em simpatria em mais de uma área na região do Vale do Ribeira do Paraná? Quais seriam as espécies prevalentes em cada município? Qual seria o papel do Complexo *L. intermedia* em cada município estudado? Qual seria o nível de estruturação genética das populações de *L. intermedia s.l.* nestas áreas?

Neste sentido, analisando dois diferentes municípios na região do Vale do Ribeira, Estado do Paraná, propõe-se investigar o complexo *L. intermedia*,

---

<sup>1</sup> *Lutzomyia intermedia sensu strictu*, uma das linhagens componentes do Complexo *Lutzomyia intermedia*

<sup>2</sup> *Lutzomyia intermedia sensu lato*: representa o Complexo *Lutzomyia intermedia* (*Lutzomyia intermedia s.s.* e *Lutzomyia neivai*)

utilizando técnicas de biologia molecular; e esclarecer o papel epidemiológico deste complexo no ciclo de *Leishmania* nesta região.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar epidemiológica, fenotípica e genotipicamente populações do Complexo *L. intermedia* na região do Vale do Ribeira, área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar quais espécies compõem a fauna flebotomínica na região do Vale do Ribeira do Paraná;

Determinar os vetores de *L. braziliensis* nas áreas estudadas;

Investigar se há variabilidade fenotípica e genotípica entre populações de *L. intermedia* na área acima mencionada;

Verificar se há diferença intra-específica na população de *L. intermedia s.l.* nas áreas estudadas;

Encontrar um marcador, por meio da técnica de RAPD, que possa distinguir as populações de *L. intermedia s.l.* segundo a sua origem.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O PROTOZOÁRIO *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 ocupam a seguinte posição sistemática, segundo LEVINE *et al.* (1980):

- Reino: PROTISTA Haeckel, 1866
- Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817
- Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963
- Subfilo: MASTIGOPHORA Desing, 1866
- Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
- Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976
- Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
- Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905

ADL *et al.* (2005) propõem incrementar a classificação de LEVINE *et al.* (1980), considerando, além das características das estruturas celulares, os resultados obtidos a partir de estudos moleculares filogenéticos. Assim, o gênero *Leishmania* pode ser enquadrado desta forma:

- Super-classe: EXCAVATA Cavalier-Smith, 2002, Simpson, 2003
- Classe: EUGLENOZOA Cavalier-Smith, 1981, Simpson, 1997
- Subclasse: KINETOPLASTEA Honigberg, 1963
- Super-ordem: METAKINETOPLASTINA Vickerman Moreira, Lopez-Garcia, Vickerman, 2004
- Ordem: TRYPANOSOMATIDA Kent, 1880, Vickerman Moreira, Lopez-Garcia, Vickerman, 2004

No Novo Mundo, o gênero *Leishmania* ocorre em 22 países, a partir da Península de Yucatán (México) até o Norte da Argentina e sul do Brasil. Dentro desta mesma região, há pelo menos 20 espécies de *Leishmania* causando uma grande variedade de sintomas clínicos (THOMAZ-SOCCOL, 1993; DESJEUX, 1996).

Por muito tempo, o estado da classificação dos protozoários do gênero *Leishmania* foi de relativa complexidade, dada a dificuldade de distinção por caracteres morfológicos entre as diferentes espécies, bem como através das manifestações clínicas (LAINSON & SHAW, 1987). Como resultado de sucessivas investigações envolvendo caracteres sorológicos e bioquímicos (ADLER, 1963) e com os trabalhos de LAINSON & SHAW (1972) (que avaliaram as características de desenvolvimento dos parasitas em meios de cultura e seu comportamento em animais de experimentação e insetos vetores), de LAINSON & SHAW (1979) (onde os autores propuseram nova classificação para os parasitas dividindo-os em três Seções, com base nas características de desenvolvimento dos promastigotas no tubo digestório do flebotomíneo), e finalmente, de LAINSON & SHAW (1987); admite-se a existência de dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, com as seguintes espécies ocorrendo no Brasil e parasitando o ser humano (FALQUETO & SESSA, 1997; BADARÓ & DUARTE, 1997; MS, 2007):

- *Leishmania (Viannia) braziliensis* (ocorrendo em todo o país)
- *L. (V.) guyanensis* (região Norte)
- *L. (V.) lainsoni* (região Norte)
- *L. (V.) shawi* (Amazônia e Nordeste)
- *L. (V.) naiffi* (Amazônia)
- *L. (Leishmania) amazonensis* (Amazônia, regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste)
- *L. (L.) infantum* (regiões Centro-oeste, Sudeste, Nordeste e Norte)

O ciclo de vida de *Leishmania* requer a participação de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Durante seu ciclo biológico, este protozoário apresenta duas formas: amastigota e promastigota. A forma amastigota parasita o fagossoma das células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear) dos hospedeiros vertebrados (homem, animais selvagens e animais domésticos) (Figura 1). A forma promastigota habita o aparelho digestório do vetor (Figura 2) (LAINSON & SHAW, 1987).

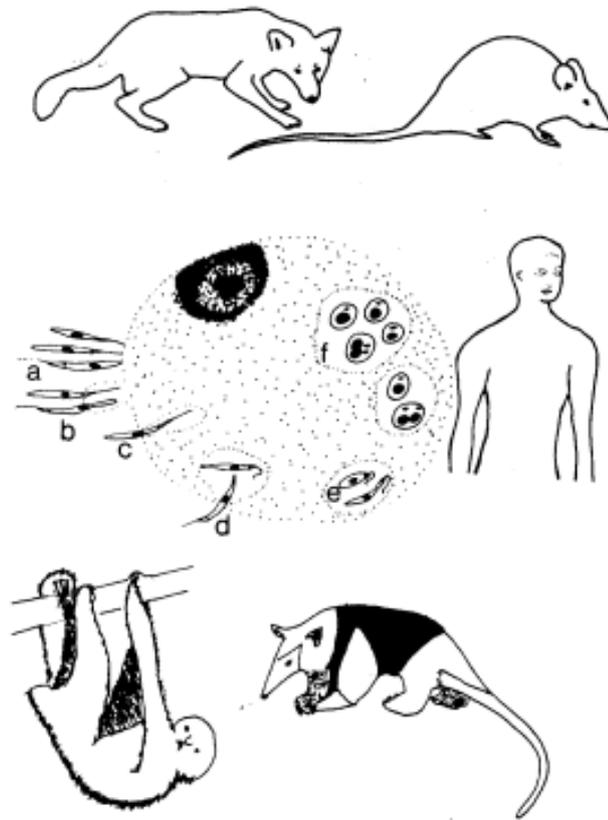


FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania* NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO (FONTE: MOLYNEUX & KILLICK-KENDRICK, 1987). LEGENDA: “a” E “b” (FORMAS PROMASTIGOTAS), “c” (INTERIORIZAÇÃO NO MACRÓFAGO), “d” (INCORPORAÇÃO NO INTERIOR DO VACÚOLO PARASITÓFORO), “e” (TRANSFORMAÇÃO NA FORMA AMASTIGOTA), “f” (MULTIPLICAÇÃO DAS FORMAS AMASTIGOTAS DENTRO DO VACÚOLO POR DIVISÃO BINÁRIA)

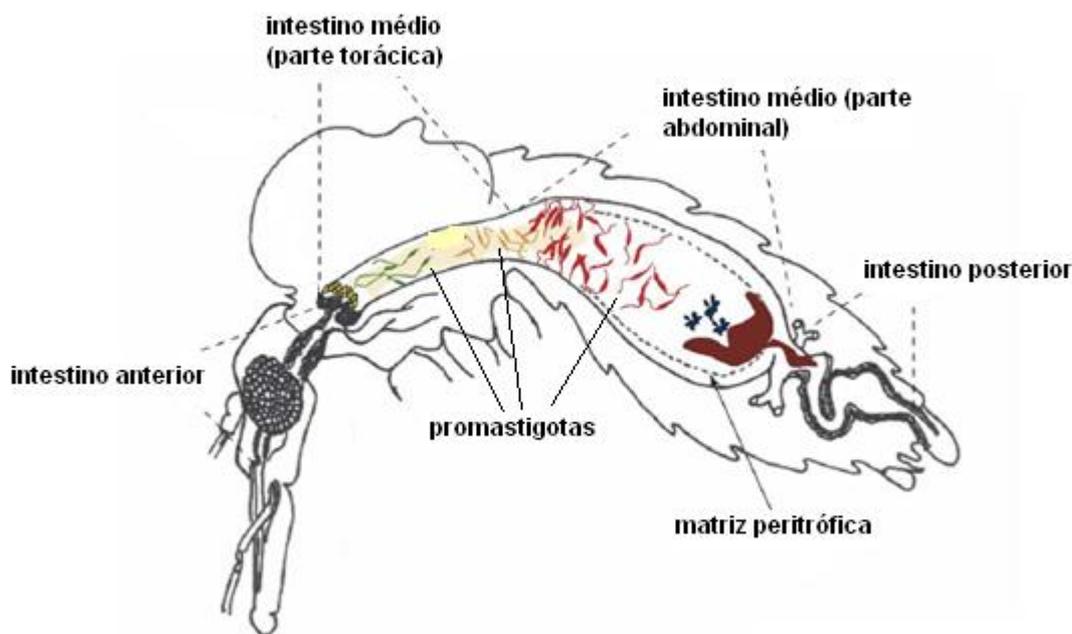


FIGURA 2 – HOSPEDEIRO INVERTEBRADO DE *Leishmania* (VETOR) COM A PRESENÇA DE FORMAS PROMASTIGOTAS NO TUBO DIGESTÓRIO. FONTE: KAMHAWI, 2006

Estudos posteriores, baseados em técnicas bioquímicas e de biologia molecular em *Leishmania*, elucidaram tanto em relação ao diagnóstico (como análise de zimodema e uso de enzimas de restrição) quanto às relações filogenéticas existentes (CHANCE *et al.*, 1974; RIOUX *et al.*, 1990; THOMAZ-SOCCOL, 1993; CUPOLILLO *et al.*, 1994).

### 3.2 AS LEISHMANIOSES

As patologias desenvolvidas por *Leishmania* no Novo Mundo podem ser divididas em duas formas genéricas: Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana (e esta em vários subtipos).

Estima-se que as leishmanioses apresentam uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, sendo que 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença em 88 países, 72 dos quais estão localizados em países em desenvolvimento. A incidência anual da forma tegumentar é estimada entre 1,5 a 2 milhões de casos por ano (WHO, 2010). A ocorrência da

forma visceral é estimada em 500.000 casos novos por ano em todo o mundo (GUERIN *et al.*, 2002).

### 3.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de evolução crônica que acomete, isoladamente ou com associação, a pele e as mucosas do nariz, boca, faringe e laringe. A moléstia tornou-se conhecida, no Novo Mundo, a partir dos trabalhos de pesquisadores no início do século XX (LINDENBERG, 1909; ESCOMEL, 1911; VIANNA, 1911).

BRUMPT & PEDROSO (1913) relataram as primeiras observações epidemiológicas sobre a doença, denominando-a “leishmaniose americana das florestas”, em alusão ao fato de que sua transmissão se relacionava com o ambiente silvestre.

A participação de animais silvestres como reservatórios do parasito nas Américas foi aventada por HERTIG *et al.* (1957), quando se demonstrou pela primeira vez a infecção em roedores silvestres, no Panamá. Em áreas florestais do Estado de São Paulo também foram encontrados animais parasitados por FORATTINI (1960). Ainda assim, existem poucas informações sobre seus hospedeiros silvestres, tendo sido relatado parasitas semelhantes em roedores (*Akodon sp.*, *Proechimys sp.*, *Rattus sp.*, *Oryzomys sp.* e *Rhipidomys sp.*) e no marsupial *Didelphis sp.* (LAINSON & SHAW, 1987; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BASANO & CAMARGO, 2004; CASTRO *et al.*, 2007).

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A Tabela a seguir demonstra as espécies causadoras de LTA no Brasil, bem como seus principais vetores.

TABELA 1 – ESPÉCIES CAUSADORAS DE LTA NO BRASIL E SEUS RESPECTIVOS VETORES (GRIMALDI *et al.*, 1989)

<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>	<b>Espécie(s) Vetora(s)</b>
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , <i>L. reducta</i> , <i>L. olmeca nociva</i>
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. umbratilis</i> , <i>L. anduzei</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. intermedia s.l.</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>L. migonei</i>
<i>L. shawi</i>	<i>L. whitmani</i>
<i>L. naiffi</i>	<i>L. ayrozai</i> , <i>L. paraensis</i> , <i>L. squamiventris</i>
<i>L. lainsoni</i>	<i>L. ubiquitalis</i>
<i>L. lindenberg</i>	<i>L. antunesi</i>

No ser humano, a doença manifesta-se inicialmente na pele, no sítio da picada do flebotomíneo. A partir do foco primário, o parasita pode originar novas lesões na pele ou nas mucosas. De acordo com a localização e a natureza das lesões, distinguem-se três formas clínicas da moléstia (MS, 2007), descritas a seguir.

### 3.2.1.1 Leishmaniose Cutânea

A infecção cutânea pode permanecer subclínica ou tornar-se clinicamente aparente após um variável período de incubação. As lesões evoluem de pápulas para nódulos, com formações de úlceras contendo uma depressão central. Ao longo dos meses, as lesões evoluem para cicatrizes atróficas. Algumas não ulceram, porém persistem como nódulos ou placas (HERWALDT, 1999).

A úlcera típica de leishmaniose cutânea é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e

com granulações grosseiras. A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera. Adicionalmente, a infecção secundária e o uso de produtos tópicos podem causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (forma ectimóide) (MS, 2007).

Determinantes da história natural e de patogenicidade da leishmaniose cutânea, incluindo a propensão para a latência, rápido auto-cura, persistência, disseminação, reativação e reinfeção, são mal compreendidos, mas incluem fatores relacionados ao comportamento do vetor, a virulência do parasita e ao comportamento do hospedeiro (resistência inata e adquirida) (HERWALDT, 1999).

### 3.2.1.2 Leishmaniose Mucocutânea

Estima-se que 3 a 5% dos casos de infecção por *L. braziliensis* desenvolvam lesão de mucosa (OLIVEIRA-NETO, 1988). *Leishmania braziliensis* é a principal espécie associada aos casos de lesão mucosa, embora outras espécies como *L. amazonensis* e *L. guyanensis* já tenham sido isoladas desta forma clínica (GRIMALDI & TESH, 1993). O intervalo de tempo entre a infecção inicial e o início das manifestações mucosas é bastante variável, porém admite-se que esta evolução ocorra dentro de um período médio de seis anos (JONES *et al.*, 1987).

Clinicamente, a Leishmaniose Mucocutânea (LM) se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da leishmaniose cutânea, com início insidioso e pouca sintomatologia (MS, 2007).

A extensão das lesões não guarda relação com o tempo de evolução. Em poucos meses, pode ocorrer destruição total do nariz e lábio superior. Outras vezes, a doença evolui durante muitos anos, com discreta perfuração do septo, sem comprometer a aparência externa. Em qualquer das situações, as lesões mostram caráter progressivo, sendo muito rara a cura espontânea (MARSDEN, 1986, 1994).

Na maioria dos casos, a LM resulta de leishmaniose cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa. Acontece com mais frequência no sexo masculino e faixas etárias usualmente mais altas do que a leishmaniose cutânea, o que provavelmente se deve ao seu caráter de complicação secundária. A maioria dos pacientes com LM apresenta cicatriz indicativa de úlcera cutânea anterior. Outros apresentam concomitantemente lesões cutânea e mucosa (MS, 2007).

### 3.2.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa

Uma forma peculiar da leishmaniose tegumentar é a forma difusa ou hansenóide, causada por parasitas do subgênero *Leishmania*, principalmente *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) venezuelensis*. Caracteriza-se pela presença de nódulos isolados ou agrupados, máculas, pápulas e placas infiltradas (CONVIT *et al.*, 1959). As lesões, aos poucos se disseminam por todo o corpo; mostram limites imprecisos, que se confundem com a pele normal (FONSECA & FONSECA, 1986).

### 3.2.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral ou Calazar é causada no Novo Mundo por protozoários da espécie *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, que é parasita das células do Sistema Fagocítico Mononuclear, principalmente daquelas localizadas no fígado, baço e medula óssea. A doença é caracterizada por febre irregular de longa duração, acentuado emagrecimento, intensa palidez cutâneo-mucosa, a qual confere um aspecto escurecido da pele nos indivíduos caucasianos. Associa-se a forte hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia (BADARÓ & DUARTE, 1997).

Desde os anos 1970, a urbanização da doença foi intensificada, principalmente nas periferias urbanas e nas zonas de transição das médias e grandes cidades (ALENCAR, 1983). A urbanização da leishmaniose visceral

tem sido relacionada a modificações ambientais causadas por ações antrópicas, pelo rápido processo migratório, pela interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados para áreas sem transmissão, e pela adaptação do vetor, *L. longipalpis*, ao peridomicílio e intradomicílio. Entre 1980 e 2005, o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, sendo 82,5% na Região Nordeste. Gradativamente, a leishmaniose visceral expandiu-se para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, passando de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005. (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

### 3.3 *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (LUTZ & NEIVA, 1912)

De acordo com YOUNG & DUNCAN (1994), os artrópodes pertencentes à espécie *L. intermedia* podem ser assim classificados:

- Classe: INSECTA Linné, 1758
- Ordem: DIPTERA Linné, 1758
- Família: PSYCHODIDAE Newman, 1834
- Subfamília: PHLEBOTOMINAE Rondani, 1840
- Gênero: *Lutzomyia* França, 1924
- Subgênero: *Nyssomyia* Barretto, 1962

Atualmente, embora não haja completo acordo entre os especialistas, são geralmente admitidos vários gêneros dentro da Subfamília Phlebotominae, que seriam: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeophlebotomus* e *Idiophlebotomus* para as espécies do Velho Mundo e *Brumptomyia*, *Warileya* e *Lutzomyia* para as espécies americanas, sendo que para o Novo Mundo apenas o último grupo apresenta importância médica e veterinária (FORATTINI, 1973; MARTINS *et al.*, 1978, GALATI, 1991; YOUNG & DUNCAN, 1994).

O gênero *Lutzomyia* engloba cerca de 400 espécies de flebotomíneos, que são distribuídos em toda região Neotropical e ao sul da região Neártica. Em torno de 33 espécies foram incriminadas como vetoras de microrganismos causadores de doenças aos humanos, como as leishmanioses e bartoneloses (causadas pela bactéria *Bartonella bacilliformis*) (TOWNSEND, 1913; YOUNG

& DUNCAN, 1994; ANDERSON & NEUMAN, 1997), e também alguns arbovírus (como os do gênero *Phlebovirus*). São incriminados também de serem vetores de protozoários dos gêneros *Endotrypanum* e *Trypanosoma* para animais (SHAW *et al.*, 2003). SOARES & TURCO (2003) mencionam a existência em *L. longipalpis* de diversos agentes infecciosos, tais como vírus, helmintos, fungos e protozoários (entre eles, *Ascogregarina chagasi*).

Os flebotomíneos constituem um grupo de insetos cujas fêmeas são hematófagas. Geralmente não ultrapassam 5 mm de comprimento, tendo pernas longas e delgadas, e o corpo densamente cerdoso. Têm como característica o vôo saltitante e a manutenção das asas abertas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Geralmente é de cor parda ("mosquito palha"), sendo que apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Apresentam vários nomes populares, variando segundo os países, estados e regiões, a saber: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado (FORATTINI, 1973; BASANO & CAMARGO, 2004).

Estes insetos têm por criadouros naturais determinados ecótopos que caracterizam-se por oferecer proteção em relação à chuva e iluminação, e onde se acumula matéria orgânica em decomposição com considerável quantidade. Esta pode ser constituída por folhas, detritos, vegetais diversos, restos de artrópodes, fezes de animais e humus em geral, tais como troncos e raízes de árvores, tocas de animais, solo florestal e folhas caídas, rochas, currais e chiqueiros (FORATTINI, 1973).

As larvas dos flebotomíneos, sendo terrestres, necessitam de ambiente úmido para poderem se desenvolver. Não resistem à dessecação e a períodos variáveis de umidade ao nível de saturação. Embora possam manter-se por alguns dias no meio líquido, chegando a cerca de 12 dias em algumas espécies e para formas de quarto estágio, não conseguem ir além porque o processo da muda, mesmo se iniciado, não chega a se completar quando as larvas se encontram imersas na água (CHANOTIS, 1967).

Formas imaturas de *L. intermedia* foram encontradas por FORATTINI (1960) em chiqueiro e bananal, no Estado de São Paulo, e em base de arbustos (FORATTINI, 1954), também no Estado de São Paulo. DOMINGOS *et*

*al.* (1998) assinalam que durante e após períodos intensos de precipitação pluviométrica, a população de *L. intermedia* tende a reduzir-se, possivelmente devido ao impacto que as chuvas ocasionam nos criadouros da espécie, os quais parecem estar associados ao solo sob dossel compacto da mata.

FORATTINI *et al.* (1976) consideram que a temperatura e umidade ótimas para a atividade dos flebotomíneos seja ao redor de 20°C e acima de 90%, respectivamente.

*Lutzomyia intermedia* possui distribuição geográfica em todo território nacional. Foi descrita por LUTZ & NEIVA (1912) a partir de exemplares coletados na Fazenda Ouro Fino, Minas Gerais. É considerada uma das primeiras espécies de flebotomíneos descritas na região neotropical (RANGEL & LAINSON, 2003).

Estudos mais consistentes sobre a biologia de *L. intermedia* datam do início da década de 40, com base em observações realizadas no Estado de São Paulo, onde são abordados aspectos do comportamento de algumas espécies de flebotomíneos (BARRETTO, 1943).

*Lutzomyia intermedia* é tida como sendo bastante domiciliada. Várias observações apontaram a invasão dos domicílios por parte desse flebotomíneo como fato freqüente, mesmo em períodos de baixas temperaturas (BARRETTO, 1943; NERY-GUIMARÃES, 1955).

De acordo com FORATTINI (1973), as formas adultas são de tonalidade castanha, sem diferenças acentuadas entre as várias partes do corpo. A fórmula palpal é 1.4.5.3.2 ou (1.4).5.(2.3), sendo o V artigo de comprimento menor ou equivalente aos do III ou II. As espermatecas (Figura 3) apresentam o corpo segmentado, dotado de cabeça volumosa, com cerca de 10 anéis subiguais, formando conjunto separado em relação ao duto individual, com o qual se continua após transição brusca. Os dutos individuais são cerca de duas vezes mais longos do que o corpo, finamente estriados, abrindo-se separadamente após aumentar progressivamente de diâmetro, sendo praticamente inexistente o duto comum. Os machos possuem a genitália (Figura 3) com o basistilo delgado e o dististilo dotado de quatro espinhos, sendo um terminal, um inserido no terço distal e dois situados aproximadamente no mesmo nível correspondendo a pouco além do nível médio do segmento. O edeago é triangular e esclerotizado, o aparelho

espiracular é dotado de bomba ejaculadora grande e dutos ejaculadores calibrosos, mas de comprimento que não chega a ser equivalente ao dobro da bomba. A extremidade distal desses dutos é ligeiramente curva e dilatada em colher.

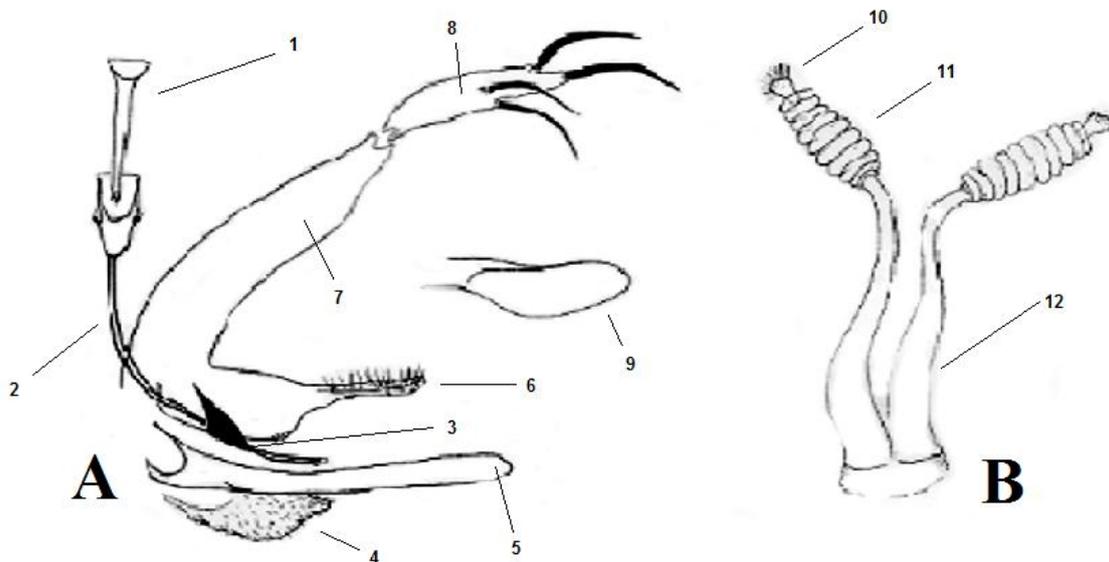


FIGURA 3 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA GENITÁLIA MASCULINA (A) E ESPERMATECAS (B) DE *L. intermedia* (FONTE: FORATTINI, 1973). LEGENDA: 1: BOMBA EJACULADORA, 2: FILAMENTOS EJACULADORES, 3: EDEAGO, 4: LAMELA SUBMEDIANA, 5: LOBO LATERAL, 6: PARÂMERO, 7: BASISTILO, 8: DISTISTILO, 9: EXTREMIDADE DISTAL DOS DUTOS EJACULADORES, 10: CABEÇA DA ESPERMATECA, 11: CORPO DA ESPERMATECA, 12: DUTO DA ESPERMATECA.

Ao analisar populações de *L. intermedia* de diferentes regiões do Brasil, MARCONDES (1996, 1997) propôs a redescritção de *L. (N.) neivai*, até então considerada sinonímia de *L. intermedia*. Distingue, pelo uso de marcadores morfológicos e seqüenciamento de DNA mitocondrial, duas espécies distintas, pertencentes ao Complexo *L. intermedia*: *L. intermedia* s.s. e *L. neivai*. Pelas observações de ANDRADE-FILHO *et al.* (2003, 2006), as principais características morfológicas consistem, nas fêmeas: o número de anéis da espermateca, dimensões dos dutos individuais (Figura 4) e número de dentes horizontais no cibário. Quanto aos machos, a característica diferencial consistiria no ápice dos dutos ejaculadores (Figura 5). A Tabela 2 faz um resumo das características diferenciais apontadas por estes autores.

MARCONDES *et al.* (1999) sugerem ainda que as dimensões de *L. intermedia* são influenciadas pela altitude, latitude e período de captura.

Com o objetivo de estudar a variação ocorrida em fêmeas destes dois grupos, provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, ANDRADE-FILHO *et al.* (2006) analisaram o número de dentes horizontais no cibário e o número de anéis e forma da cabeça da espermateca. Estes autores observaram que o número de anéis nas espermatecas foi significativamente maior em *L. intermedia* s.s. e a forma da cabeça da espermateca simples predominou em ambas. Com relação ao cibário, encontraram uma variação de oito a onze dentes horizontais nas duas espécies, chegando a doze em *L. intermedia* s.s.. O número de dentes horizontais e a forma da cabeça da espermateca foram variáveis em todas as populações estudadas e todas as estruturas pesquisadas foram consideradas polimórficas.

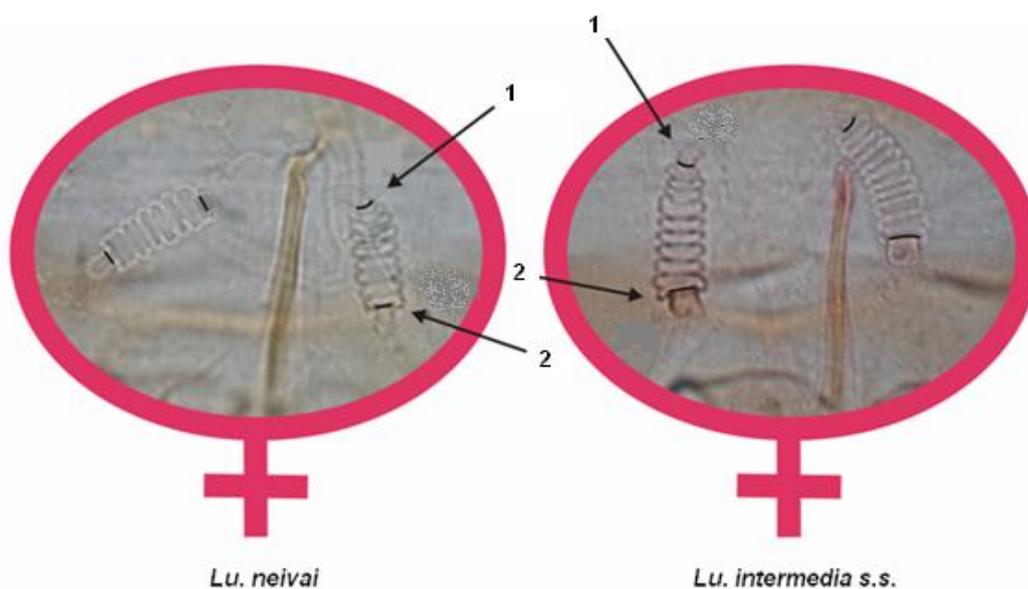


FIGURA 4 - DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE AS ESPERMATECAS DE *L. neivai* E *L. intermedia* s.s.: EM *L. neivai*, DIÂMETRO APICAL DO DUTO INDIVIDUAL (1) COM A MESMA MEDIDA DO DIÂMETRO BASAL DA CABEÇA DA ESPERMATECA (2), RESPECTIVAMENTE, NA PARTE BASAL E APICAL DO CORPO DAS ESPERMATECAS, E CORPO DAS ESPERMATECAS CONTENDO 6 A 11 ANÉIS. EM *L. intermedia* s.s., DIÂMETRO APICAL DO DUTO INDIVIDUAL (1) MENOR QUE A MEDIDA DO DIÂMETRO BASAL DA CABEÇA DA ESPERMATECA (2), E CORPO DAS ESPERMATECAS CONTENDO 9 A 17 ANÉIS. (CRÉDITOS DAS FOTOS E DESENHOS: DEMILSON RODRIGUES DOS SANTOS, MATERIAL DE ADRIANÓPOLIS)

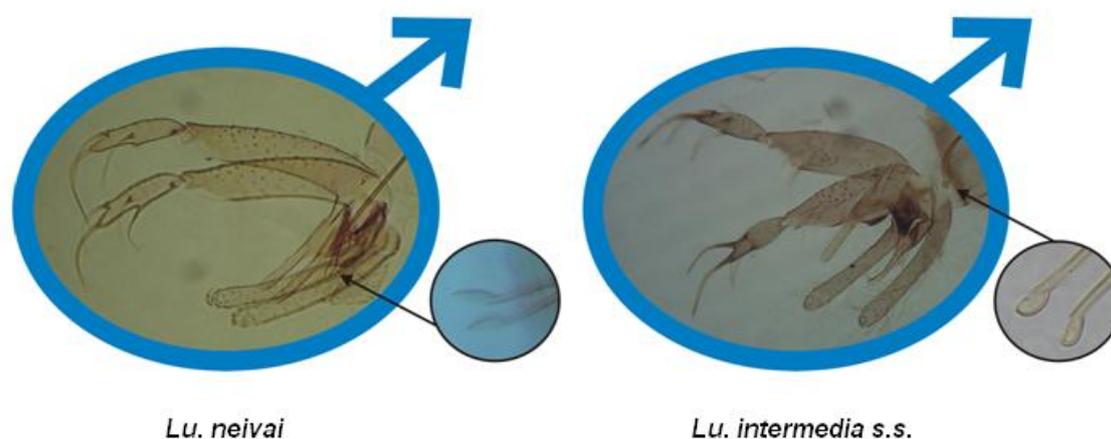


FIGURA 5 - DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE OS APARELHOS GENITAIS MASCULINOS DE *L. neivai* E *L. intermedia s.s.*: ÁPICE DOS DUTOS EJACULADORES EM FORMA DE COLHER (*L. neivai*) E EM FORMA DE CONCHA (*L. intermedia s.s.*). (CRÉDITOS DAS FOTOS E DESENHOS: DEMILSON RODRIGUES DOS SANTOS, MATERIAL DE ADRIANÓPOLIS)

TABELA 2 – DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE *L. neivai* E *L. intermedia s.s.* DE ACORDO COM MARCONDES (1997) e ANDRADE-FILHO *et al.* (2006)

	<i>L. neivai</i>	<i>L. intermedia s.s.</i>
Fêmeas		
Número de anéis na espermateca	6 a 11	9 a 17
Número de dentes horizontais no cibário	5 pares	4 pares
Dimensões dos dutos individuais femininos	Em média, 5 vezes mais longos que o duto comum	Em média, 2 vezes mais longos que o duto comum
Machos		
Ápice dos dutos ejaculadores	Forma de colher	Forma de concha

### 3.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LTA vem sendo notificada em todos os Estados do Brasil. Dos 13.384 casos registrados na região sul do país no período de 1980 a 2005, 98,7% ocorreram no Paraná. Neste Estado, os casos de leishmaniose tegumentar estão distribuídos em 276 municípios, da seguinte forma: em 173 foram notificados de um a nove casos, em 62 municípios de 10 a 24, em 23 municípios de 25 a 49, em 11 municípios de 50 a 99 e em sete municípios, 100 ou mais casos. (TEODORO *et al.*, 2006; MS, 2007).

No Brasil, A partir da década de 80, verifica-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Observam-se picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos (Figura 6), a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país. No período de 1985 a 2005, verifica-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes, verificando-se coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (MS, 2007).

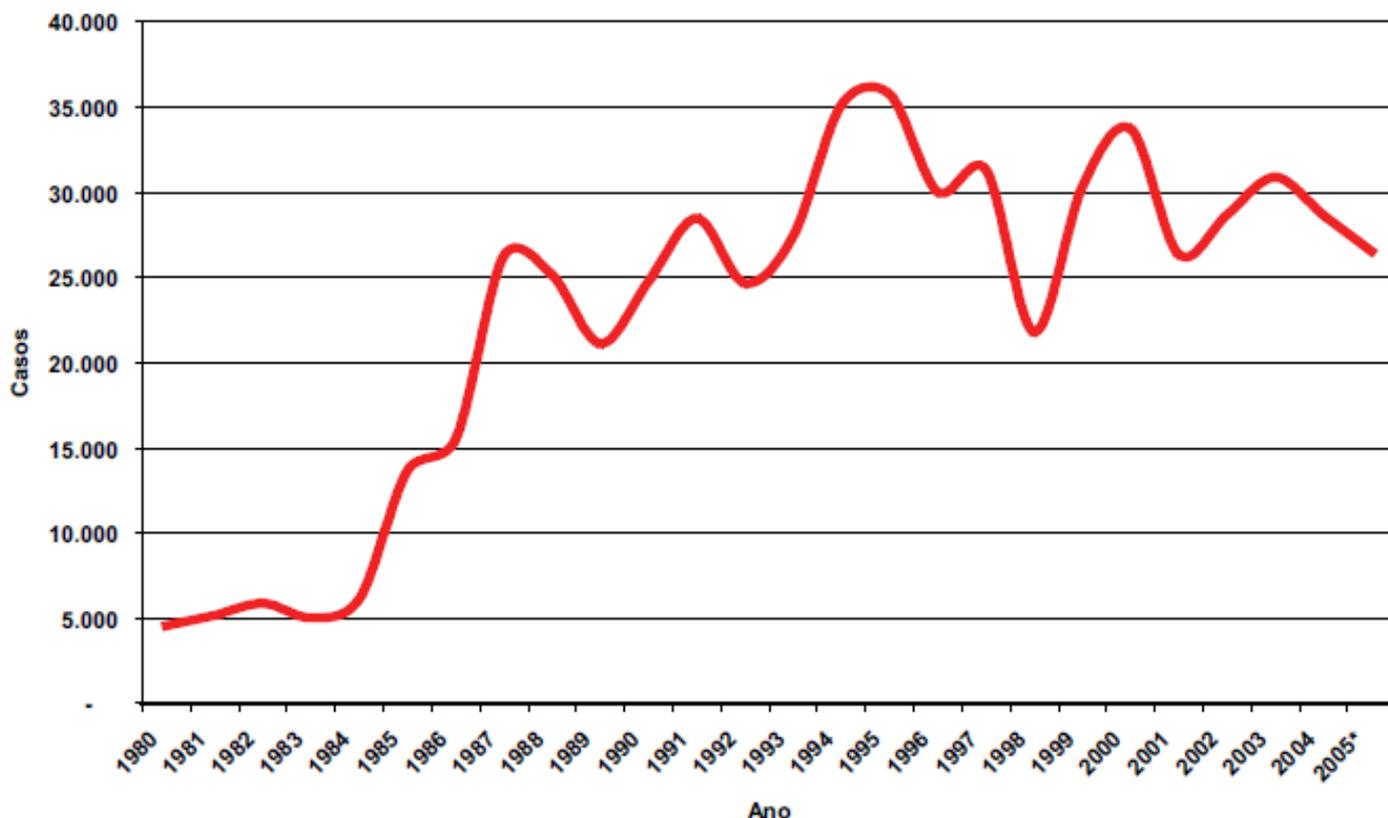


FIGURA 6 – CASOS NOTIFICADOS DE LTA – BRASIL, 1980 A 2005. FONTE: MS, 2007

No Paraná, o parasito isolado de seres humanos das diferentes regiões é *L. braziliensis* (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2005). O vetor, *L. whitmani*, foi encontrado infectado com a mesma espécie (LUZ *et al.*, 2000). Apenas um animal silvestre (*Nectomys* sp.) foi encontrado infectado com *L. braziliensis* (THOMAZ - SOCCOL *et al.*, 2003).

A transmissão autóctone no Paraná é encontrada em três regiões: no Vale do Ribeira (Leste), onde a doença tem sido registrada há mais de um século (CASTRO *et al.*, 2005); no Norte do Estado, onde os casos de leishmaniose tegumentar foram representados por um surto em 1994 (LUZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2007) e na região Central, onde a leishmaniose só tem sido notificada desde 2002 (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

Na região do Vale do Ribeira, a leishmaniose tegumentar passou a ser conhecida com o registro dos primeiros casos humanos feitos na década de 1950 por MIRANDA & SCHWEIDSON (1955) e FORATTINI & OLIVEIRA (1957). A comparação deste evento, com o tempo de colonização da

população humana na região já sugeriria, desde então, uma endemia tardia em relação ao desflorestamento (GOMES *et al*, 1990).

A distribuição da LTA é influenciada por fatores geográficos e climáticos que determinam a distribuição dos diferentes vetores – flebotomíneos - parasitas e reservatórios. As condições do clima tropical, e altitudes de até 800m acima do nível do mar, favorecem a transmissão de *L. braziliensis* (FERREIRA *et al.*, 2001).

A LTA é uma doença de cadeia de transmissão complexa sujeita, em uma mesma região, a diversos determinantes, incluindo o desequilíbrio ecológico produzido pela ação invasiva do homem aos nichos naturais da infecção, as variações sazonais e a susceptibilidade da população. A LTA é originalmente silvestre, mas vem ocorrendo em áreas rurais e urbanas. A doença ocorre em locais onde há derrubada de matas e colonização recente, mas ultimamente vem sendo verificada também em áreas de colonização antrópica antiga, onde existem matas residuais ou de segunda formação (MARTINS *et al.*, 2004). Este aspecto ecológico explica porque há relação fundamental entre: o ser humano, seu contato com as florestas e a manifestação da doença (GOMES *et al*, 1990; GOMES & NEVES, 1998).

ARAGÃO (1922) incriminou *L. intermedia* como vetor potencial de *L. braziliensis*, ao produzir no focinho de um cão uma úlcera contendo formas amastigotas conseqüentes à inoculação de triturado de exemplares desses flebotomíneos infectados, que haviam sugado pessoas doentes, na cidade do Rio de Janeiro.

A partir de então, diversos estudos, ao longo dos anos, acumularam evidências que sugerem *L. intermedia* como transmissor do agente causal de LTA em áreas endêmicas no Sudeste e Sul do Brasil, esta última região incluindo algumas áreas do Estado do Paraná, como o Vale do Rio Ribeira, que perfaz também parte do Estado de São Paulo.

Em pesquisa desenvolvida por LEMOS & LIMA (2005), no município de Uberlândia (MG), das oito espécies de flebotomíneos encontradas, 99,9% foram de *L. intermedia*. Esse achado está em função da alteração ocasionada no local das capturas, com algumas árvores nativas, plantio de frutíferas e, principalmente, a quantidade de bananeiras cultivadas neste local, favorecendo um ambiente úmido e sombrio.

FORATTINI *et al.* (1976) em suas pesquisas em ambiente domiciliar aferiram a tendência da população local de *L. intermedia* de invadir as casas, não apenas para praticar a hematofagia, como também para encontrar abrigo.

SILVA & GOMES (2001), procurando investigar a infectividade natural e suscetibilidade experimental, para aclarar a competência vetorial de *L. intermedia* do Vale do Ribeira (SP), verificaram a exposição deste flebotomíneo à estirpes de *L. braziliensis* oriundas do Amazonas e Vale do Ribeira, encontrando percentuais significativos de positividade tanto para fêmeas silvestres quanto para fêmeas de laboratório com idade entre dois e três dias. A suscetibilidade às estirpes testadas, associada aos indicadores epidemiológicos concorrem para a suspeita do papel vetorial de *L. intermedia* no Vale do Ribeira.

A história natural da LTA em nosso país tem registrado inúmeros surtos epidêmicos, cujos primeiros ocorreram muito tempo atrás quando da devastação maciça da mata Atlântica, na região Sudeste do Brasil. O mesmo fato se repete mais expressivamente diante da destruição da floresta amazônica, motivo pelo qual a Leishmaniose Tegumentar assume importância mais destacada (GOMES, 1992).

A colonização das regiões devastadas traz contingente populacional humano mais estável que fixa suas residências em fazendas, sítios e vilas, enquanto que os limites ecológicos dos focos de leishmaniose, onde continuam sendo transmitidos os parasitas, se restringem às matas remanescentes e residuais. Neste caso, o desequilíbrio ambiental impõe barreiras ecológicas aos hospedeiros e vetores naturais de *Leishmania*, que ao lado do estado imunitário dos indivíduos, parecem compor fatores que influenciam o aumento sensível da incidência ou a forma esporádica de sua manifestação (GOMES, 1992).

No Estado do Paraná, os estudos sobre a composição da fauna flebotomínea têm ocorrido mais intensivamente na região norte, que concentra o maior número de casos de LTA (TEODORO *et al.* 1997; SILVA *et al.*, 2008).

Observou-se que a riqueza de flebotomíneos no Paraná está relacionada com a existência de matas remanescentes. Contudo, a frequência e a densidade de flebotomíneos no ambiente antrópico parecem depender do grau de degradação dessas áreas e da existência de fontes alimentares

representadas, principalmente, pela criação de animais domésticos. (SILVA *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por MASSAFERA *et al.* (2005) no município de Bandeirantes (norte do Paraná), foi relatado que a proximidade dos abrigos de animais domésticos do domicílio, o acúmulo de matéria orgânica (folhas e frutos caídos, resíduos agrícolas, fezes de animais domésticos e restos de alimentos a eles oferecidos), a umidade do solo provocada pelo descarte de águas de uso doméstico e pelo sombreado das árvores, podem favorecer a formação de criadouros de flebotomíneos no peridomicílio.

TEODORO & KÜHL (1997), assinalaram a dominância de *L. intermedia* sobre outras espécies em área com alto grau de antropia, no norte do Paraná. A dominância de *L. intermedia* pode ser em função do ambiente altamente degradado e de sua melhor adaptabilidade neste ambiente. Os autores relatam ainda, que o número de flebotomíneos diminuiu sensivelmente em duas residências com o deslocamento de uma pocilga, à distância de 100 metros das residências, e a desobstrução do porão de uma das residências. Estes fatos vão de encontro aos resultados obtidos pela análise de TEODORO *et al.* (2004), que verificaram um decréscimo da população de flebotomíneos após medidas de reorganização e limpeza do ambiente de estudo (Município de Jussara, noroeste do Paraná).

Em localidades rurais das mesoregiões Norte Central e Centro Ocidental do Paraná, onde foram registrados vários casos de LTA, envolvendo mulheres, crianças e cães, TEODORO *et al.* (2006) realizaram coletas de flebotomíneos, e verificaram *L. intermedia* s.l. como segunda espécie mais prevalente, atrás de *L. whitmani*.

No norte do Paraná, os flebotomíneos são coletados em maior número em abrigos de animais domésticos, num ambiente peridomiciliar com o solo úmido, rico em matéria orgânica e sombreado; ou então capturados no interior de residências, quando estas localizam-se muito próximas de abrigos de animais domésticos (MASSAFERA *et al.*, 2005; TEODORO *et al.*, 2006).

### 3.5 ESTUDOS GENÉTICOS DE FLEBOTOMÍNEOS

A aplicação de técnicas moleculares está sendo desenvolvida em flebotomíneos sob diferentes perspectivas.

Análises da evolução dos genes mitocondriais (citocromo b e ND4) e os nucleares ITS2 e fator  $\alpha$  de alongamento, vêm sendo usadas para ordenar relações intraespecíficas e subgenéricas, respectivamente (ISHIKAWA *et al.*, 1999; DEPAQUIT *et al.*, 2000; URIBE SOTO *et al.*, 2001; TESTA *et al.*, 2002).

MARCONDES *et al.* (1997), analisaram a seqüência nucleotídica de DNA mitocondrial de exemplares de *L. intermedia* provenientes de seis localidades de cinco estados do Brasil. Separaram dez haplótipos, cada qual associado à morfologia de algum dos agrupamentos que constituem o complexo *L. intermedia* (*L. intermedia* s.s. e *L. neiva*), com exceção de um, que ocorreu em insetos com morfologia dos dois agrupamentos, levando a suspeitar de introgressão. Marcadores mitocondriais e isoenzimáticos também foram definidos para quatro clados de *L. longipalpis* (ARRIVILLAGA *et al.*, 2003).

Seqüências do DNA ribossomal (18SrDNA e domínio D2 do 28SrDNA) foram utilizados para reavaliar os níveis de relações no interior da subfamília Phlebotominae (DEPAQUIT *et al.*, 1998; ARANSAY *et al.*, 2000) e no interior dos gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* (ARANSAY *et al.* 2000). De acordo com DEPAQUIT *et al.* (1998), *Lutzomyia* é um gênero monofilético.

BEATI *et al.* (2004) realizaram seqüenciamento, a partir de 32 espécies de *Lutzomyia* obtidas no Peru e Colômbia, utilizando-se de pequenos fragmentos da subunidade mitocondrial 12SrRNA e da subunidade nuclear 28SrRNA do gene ribossomal. Variabilidade intraespecífica em *Lutzomyia* ocorreu dentro de vários táxons, com distância de valores que variaram normalmente entre 0 e 0,4%.

SILVA (2000), investigando a possibilidade de variação genética em quatro populações de *L. migonei* de regiões geograficamente distintas (Parque Estadual do Turvo, RS; Santa Maria, RS; São Paulo e Venezuela), utilizou a técnica de RAPD-PCR (Amplificação Polimórfica de DNA ao Acaso/Reação em Cadeia da Polimerase), sendo que, de dez "primers" testados, apenas três

amplificaram fragmentos polimórficos entre as populações, e este polimorfismo foi observado somente entre a população da Venezuela em relação às populações brasileiras, podendo estar associado com a distribuição geográfica e espacial dos espécimes.

Descrita por WILLIAMS *et al.* (1990), a reação de amplificação para RAPD é baseada na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para amplificar um dado segmento de DNA pela PCR, deve-se utilizar um par de “primers” que flanqueiam a região alvo e se pareiam às fitas opostas. O RAPD, por sua vez, baseia-se na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, onde a estratégia é utilizar oligonucleotídeos de 10 bases como iniciadores para amplificar DNA genômico. Utiliza-se sempre um único iniciador em cada reação. A amplificação ocorrerá quando coincidir de o “primer” reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, porém em orientação invertida na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo de limite da PCR. O RAPD é uma técnica altamente sensível capaz de detectar diferenças de nucleotídeos entre o oligonucleotídeo e o molde de DNA, incluindo diferenças de um único nucleotídeo.

MENESES *et al.* (2005) realizaram estudo microgeográfico no município de Mesquita (Rio de Janeiro), empregando na população de *L. intermedia* três diferentes marcadores moleculares – MLEE (eletroforese de enzima multiloco), RAPD/PCR e SSCP/PCR (Polimorfismo de Conformação de Fita Única/PCR); revelando homogeneidade genética desta espécie. RAPD ainda tem sido utilizado para diagnóstico de *L. verrucarum* (ADAMSON *et al.*, 1993) e de outras espécies do Velho e Novo Mundo (LANZARO & WARBURG, 1995).

Trabalhos envolvendo a diferenciação genética entre populações de *L. longipalpis* foram realizados ao longo dos últimos anos, muitos dos quais apontando que este grupo consiste num complexo de espécies crípticas, dentro dos seguintes enfoques: perfil de isoenzimas (AZEVEDO *et al.*, 2000); propriedades dos feromônios e dos sons da cômte (OLIVEIRA *et al.*, 2001; BAUZER *et al.*, 2002); determinação dos cariótipos de larvas de quarto estágio a partir de células cerebrais (YIN *et al.*, 1999) e testes de divergência usando o gene *period* como marcador (PEIXOTO *et al.*, 2001; BAUZER, 2002).

Utilizando o gene *period*, MAZZONI *et al.* (2006) estudaram a variação dentro deste gene em cinco diferentes populações de *L. intermedia* e *L.*

*whitmani*, encontrando haplótipos “típicos” de uma espécie em indivíduos de outra espécie, quer sugerindo a ocorrência de introgressão ou a persistência de velhos polimorfismos.

MILES & WARD (1978) foram os primeiros a desenvolverem métodos para a caracterização isoenzimática de flebotomíneos (*Lutzomyia flaviscutellata*); e o aprimoramento desta técnica vem sendo realizado com o uso de isoeletrofocalização com géis de agarose (PESSON *et al.*, 1991).

Na continuidade dos estudos genéticos, cópias dos genes ribossomais ou de DNA repetitivo não codificador (READY *et al.*, 1988; READY *et al.*, 1991) foram isoladas a partir de bibliotecas de DNA recombinante, que haviam sido construídas ligando o DNA genômico da espécie-alvo de flebotomíneo em vetores de clonagem (bacteriófagos ou plasmídeos) (BROW, 1997).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Descrição da área de estudo

O Estado do Paraná localiza-se na Região Sul do Brasil, entre 22°30'58"e 26°43'00" de latitude Sul e 48°05'37"e 54°37'08" de longitude Oeste. Apresenta um relevo de altitudes modestas, nas quais distinguem-se três unidades topográficas distintas: Região de Planície, Região de Escarpas e Região de Planalto. A primeira compreende a Planície Litorânea; a segunda, o Maciço Atlântico, dividido em Serra do Mar e Geral, sendo que esta última subdivide-se em Serra Geral Oriental e a terceira unidade compreende o Planalto Cristalino Atlântico, dos Campos Gerais e o de Guarapuava.

O Planalto Cristalino Atlântico Paranaense, denominado de Primeiro Planalto Paranaense, estende-se desde o alto das cristas da Serra do Mar para o ocidente, até o ramo Oriental da Serra Geral, abrangendo uma área de 17.456 km<sup>2</sup> aproximadamente.

O Primeiro Planalto Paranaense pode ser dividido em três sub-zonas; ao sul, o Planalto de Curitiba; ao norte, a Zona Montanhosa do Açungui e a noroeste, o Planalto do Maracanã. O Planalto de Curitiba apresenta um relevo suavemente ondulado, onde se localiza a capital Curitiba, sendo separada da zona montanhosa do Açungui pelos divisores de águas das bacias do Iguaçu e do Ribeira, a qual apresenta uma paisagem recente de elevações, orientadas por sucessão de espigões alongados e vales em forma de "V" profundos. É uma região de relevo enérgico, apresentando cota de altitude superior a 75m mais do que o nível geral do planalto de Curitiba (CAMARGO, 1998).

As cartas climáticas do estado mostram que há três tipos de clima, segundo a classificação de Köppen: 1) Af, clima tropical superúmido, sem estação seca, com temperatura média em todos os meses superior a 18°C (megatérmico), precipitação média no mês mais seco acima de 60mm e isento de geadas; 2) Cfa, clima subtropical; temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de

concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida; 3) Cfb, clima temperado propriamente dito; temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida (IAPAR, 1994).

A vegetação primitiva do Paraná, que era constituída por diversos tipos de matas, logo no início do século XX começou a ser destruída para a extração de madeiras, expansão das lavouras cafeeiras e exploração do carvão vegetal. Em menos de meio século, as florestas de cobertura primitiva praticamente desapareceram. Em 1980, delas restavam apenas 5% e, em 1990, só 2,6% da vegetação original, a maioria em parques e áreas de proteção e conservação das matas remanescentes (CIGOLINI *et al.*, 1998).

A Bacia do Ribeira é formada pelo rio Ribeira que nasce com o nome de Açungui, na Serrinha, município de Campo Largo, indo receber pela margem esquerda na divisa dos municípios de Rio Branco do Sul com Cerro Azul o rio Ribeirinha. Daí em diante recebe o nome de Ribeira até a sua foz na baía de Iguape, no Estado de São Paulo. O seu curso é de 502 km dos quais 210 em território paranaense, desde a nascente até a foz do Pardo, e 292 km em território paulista, desde a foz do rio Pardo até a sua embocadura no Atlântico. O Ribeira, em território paranaense, possui os seguintes tributários: o Ribeirinha, o Turvo e o Itabirapuã, pela margem esquerda; o Santana, o Ponta Grossa, o do Rocha, o Grande e o Pardo, pela direita (CAMARGO, 1998).

A Região do Vale do Ribeira no Estado do Paraná é composta pelos municípios de Adrianópolis, Bocaiúva do Sul, Cerro Azul, Doutor Ulysses, Itaperuçu, Rio Branco do Sul e Tunas do Paraná, sendo a maior concentração dos habitantes na área rural, com exceção de Itaperuçu e Rio Branco do Sul, que se aglomeram na área urbana. A densidade populacional média da região é relativamente baixa, com 139,89 hab/km<sup>2</sup>. Os municípios da região têm suas economias atreladas à agricultura familiar, à extração mineral, vegetal e animal. Na região, a renda familiar baixa e a falta de perspectivas e de oportunidades de negócios, vêm favorecendo o aparecimento de bolsões de pobreza, tanto na área rural quanto na urbana. Esta situação está relacionada com a perda populacional crescente na região nos últimos anos (PROGRAMA VALE DO RIBEIRA, 2010).

As coletas dos insetos deram-se nos municípios de Cerro Azul e Adrianópolis (Figura 7). Segundo IPARDES (2010), a área do município de Cerro Azul, situado numa altitude de 393 metros, equivale a 1.341 km<sup>2</sup>, sendo a população estimada em 2009 de 18.660 habitantes. De acordo com a mesma fonte, Adrianópolis, com 154 metros de altitude, possui 6.856 habitantes (população estimada em 2009) distribuídos numa área de 1.349 km<sup>2</sup>.

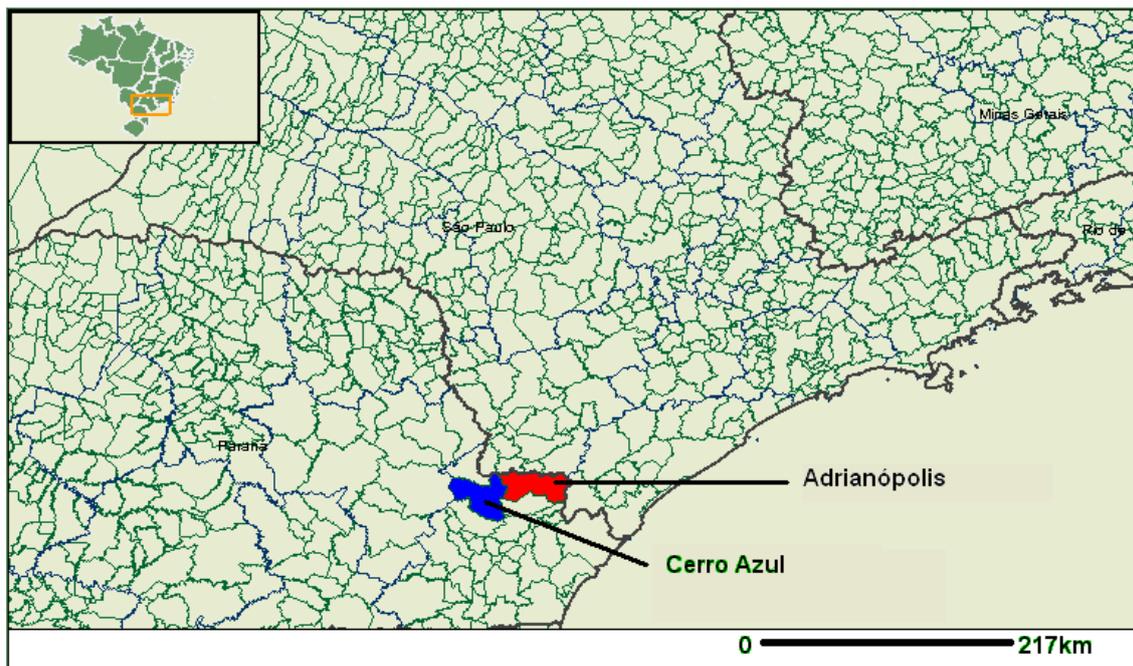


FIGURA 7 – A REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA, COM DESTAQUE PARA OS MUNICÍPIOS DE CERRO AZUL E ADRIANÓPOLIS

#### 4.2 Métodos de captura dos flebotomíneos

Nas coletas foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC (“Communicable Diseases Center”), originalmente descrita por SUDIA & CHAMBERLAIN (1962).

Os ecótopos onde foram instaladas estas armadilhas foram o domicílio, peridomicílio e mata (Figura 8 – A, B e C). As coletas deram-se nos meses de dezembro de 2008 (1 noite) e fevereiro (3 noites), maio (1 noite) e novembro (1 noite) de 2009; no período das 19 às 24h.



FIGURA 8A – FOTO DE DOMICÍLIO (CERRO AZUL)

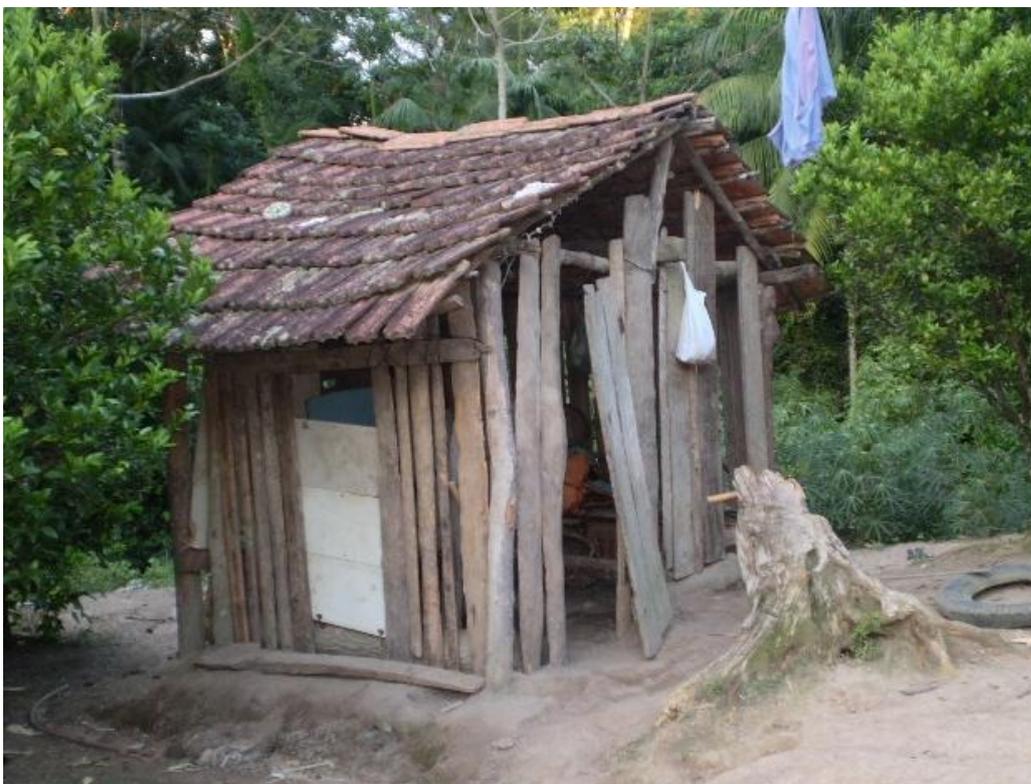


FIGURA 8B – FOTO DE UM GALINHEIRO (PERIDOMICÍLIO - CERRO AZUL)



FIGURA 8C – FOTO DA MATA E ARMADILHA CDC (CERRO AZUL)

Os flebotomíneos capturados pelas armadilhas CDC mantiveram-se acondicionados em sua câmara coletora até a chegada para o laboratório.

#### 4.3 Procedimentos de Laboratório

##### 4.3.1 Identificação morfológica dos flebotomíneos

No Laboratório de Parasitologia Molecular, Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, os flebotomíneos foram separados por sexo, sob microscópio estereoscópico. Os machos foram acondicionados em tubos contendo etanol 70%, para posterior identificação. Todas as fêmeas foram dissecadas, para identificação a fresco pela morfologia da espermateca, pressionando uma lamínula sobre a lâmina a qual estava a parte final do abdome do inseto, imersa em solução salina 0,9% esterilizada. A espermateca, então visível, foi analisada sob microscópio de luz branca, com aumento total de 400 vezes.

Após estas análises, o restante do corpo das fêmeas foi acondicionado em microtubos de plástico com etanol 70%, para posterior tratamento com as técnicas moleculares.

Uma fração dos machos foi preparada para a identificação de modo que parte do seu corpo pudesse ser também preservada para a análise molecular. Sob microscópio estereoscópico, e em lâminas esterilizadas, os espécimes foram colocados em solução salina 0,9%, também esterilizada, onde as medidas de seus palpos foram analisadas e o abdome dissecado – os quatro últimos segmentos – para a preparação morfológica.

As partes finais dos abdomes foram acondicionadas em placas contendo KOH 20% por um período de 12h, até clarificação adequada. Após isso, as medidas e características das estruturas genitais masculinas foram analisadas, e as espécies identificadas (FORATTINI, 1973).

O restante do corpo foi acondicionado em etanol 70% para tratamento com as técnicas moleculares.

Para identificação dos flebotomíneos (machos e fêmeas), foi seguida a proposta de classificação de YOUNG & DUNCAN (1994).

#### 4.3.2 Isolamento de *Leishmania* em intestino de flebotomíneos

As fêmeas, logo após o transporte do campo onde foram coletadas até o laboratório, foram anestesiadas com clorofórmio e colocadas sobre lâmina estéril com uma gota de solução salina 0,9% estéril. As cabeças, asas e pernas dos insetos foram separadas do tórax e abdome. A extração do tubo digestório foi feita com auxílio de estiletos (agulhas esterilizadas) apoiados no tórax e nos dois últimos segmentos abdominais. As estruturas digestivas foram dissecadas para verificar a presença ou não de flagelados: intestino anterior, intestino médio, intestino posterior, proventrículo e faringe.

### 4.3.3 Cultivo dos protozoários

#### 4.3.3.1 Cultura *in vitro*

O sangue digerido obtido do intestino de cinco fêmeas dissecadas foi inoculado em meio bifásico (NNN - McNeal, Novy e Nicolle) e mantido em estufa a 24 °C por sete dias, e repicada a cada sete dias até a quarta repicagem, para então ser descartada em caso de não haver protozoários.

#### 4.3.4 Extração de DNA

Para a extração do DNA dos flebotomíneos seguiu-se a metodologia proposta por LOXDALE & LUSHAI (1998), com o uso de Chelex 100 (BioRad):

- Triturou-se o inseto em 300µl de Chelex 5%, dentro de microtubos esterilizados de 1,5ml, com auxílio de pistilos de plástico
- Agitou-se fortemente (vortex) por 15 seg.
- Centrifugou-se (19.500 g) por 20 seg.
- Incubou-se em banho-maria (80°C) por 30 min.
- Novamente as amostras foram agitadas fortemente e centrifugadas (19.500 g/20 seg)
- Transferiu-se o sobrenadante, que continha o DNA, para novos tubos esterilizados, sendo posteriormente armazenados no congelador.

#### 4.3.5 Amplificação Randômica de DNA (RAPD – PCR)

##### 4.3.5.1 Determinação dos Iniciadores para RAPD

Os iniciadores escolhidos, com base na literatura (REVOLLO, 1995; BAÑULS *et al.*, 1997), foram os seguintes: A10 (5'-GTGATCGCAG-3'), A2 (5'-TGCCGAGCTG-3'), A3 (5'-AGTCAGCCAC-3') e A9 (5'-GGGTAACGCC-3').

Estes marcadores, concebidos pelo Institut de Recherche pour le Développement (IRD), de acordo com Michel Tibayrenc, do Laboratório

Montpellier/France, para estudo do DNA de protozoários, foram padronizados neste trabalho, para o DNA extraído dos flebotomíneos. Uma amostragem de 52 indivíduos do complexo *L. intermedia* oriundos dos diferentes ecótopos (mata, peridomicílio e domicílio) tiveram seu DNA amplificado pela técnica de RAPD, utilizando-se os “primers” A10 e A2 (para todos os 52 espécimes) e A3 e A9 (para um subgrupo de 10 indivíduos do peridomicílio de Adrianópolis). Foram incluídos na análise um exemplar da espécie *L. pessoai*, um exemplar da espécie *L. fischeri* e dois exemplares da espécie *L. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), provenientes de Mandaguari (região Norte do Paraná) e gentilmente cedidos pelo Entomologista Demilson Rodrigues dos Santos, da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

#### 4.3.5.2 Amplificação

A reação, no volume de 25 µl (Tabela 3), procedeu com as condições indicadas na Tabela 4.

TABELA 3 – REAGENTES E VOLUMES USADOS NO RAPD (PARA 25 µL DE SOLUÇÃO TOTAL)

Reagente	Volume
Tampão (10x)	2,5 µl
“primer” (5 µM)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µl
<i>Taq</i> DNA-polimerase (5 U/µl)	0,45 µl
H <sub>2</sub> O	16,8 µl
DNA (1,64 ng/µl)	1,5 µl

TABELA 4 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DO RAPD-PCR NO TERMOCICLADOR

Ciclo no Termociclador	Temperatura	Duração
1º. (1x)	94°C	5 min
2º. (45x)	94°C	1 min
	36°C	1 min
	72°C	2 min
3º. (1x)	72°C	7 min
4º. (1x)	4°C	infinito

#### 4.3.5.3 Eletroforese

Após a amplificação por RAPD-PCR, os produtos obtidos foram submetidos à separação de acordo com o seu peso molecular por eletroforese submarina horizontal em gel de agarose 1,6% em tampão TBE 1x (Tris-Base, ácido bórico e EDTA pH 8,3) e voltagem de 60 V durante 3 horas. Como padrões de tamanho foram utilizados os marcadores de 1 kb e 100 pb Plus DNA Ladder Gibco. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente foram fotografados com aparelho de fotodocumentação e então analisados.

#### 4.3.6 Análise Fenética

Com o padrão de bandas obtido a partir do RAPD, foram criadas matrizes de dados usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e agrupando as unidades através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), que é um modelo de agrupamento hierárquico, e permite a construção de dendrogramas. Matrizes e

dendrogramas foram elaborados com o auxílio do programa NTSYS-pc 2.1 (ROHLF, 1992).

## 5 RESULTADOS

### 5.1. FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS

Ao total, 432 espécimes foram coletados (304 machos e 128 fêmeas), sendo que 211 foram capturados no domicílio, 107 no peridomicílio, e 114 na mata. As seguintes espécies foram encontradas: *L. (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (403 exemplares), *L. (Pintomyia) fischeri* (Pinto, 1926) (19), *L. (P.) pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940) (seis), *L. migonei* (França, 1920) (um) e *L. sp.* (três exemplares) (Tabela 5). As armadilhas CDC foram responsáveis pela captura da grande maioria dos exemplares (93,5%).

A maior prevalência encontrada foi de *L. intermedia s.l.*, com 219 (50,69% do total de insetos coletados) e 184 exemplares (42,59% do total de insetos coletados) em Adrianópolis e em Cerro Azul, respectivamente (Gráficos 1 e 2). Esta espécie predominou em todos os ecótopos (Gráfico 3). As demais espécies correspondem, do total de insetos coletados, a 0,69% e 6% em Adrianópolis e Cerro Azul, respectivamente. *Lutzomyia fischeri* ocupou a segunda posição, seguida de *L. pessoai* e *L. migonei*.

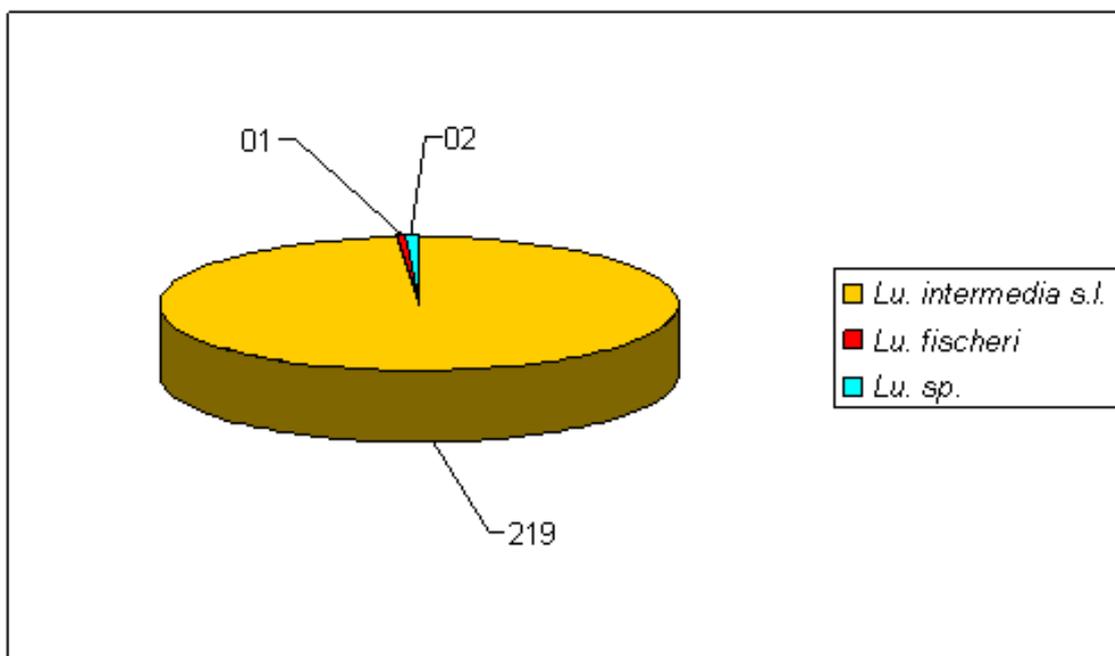


GRÁFICO 1 – NÚMERO DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE ADRIANÓPOLIS SEPARADOS SEGUNDO A ESPÉCIE

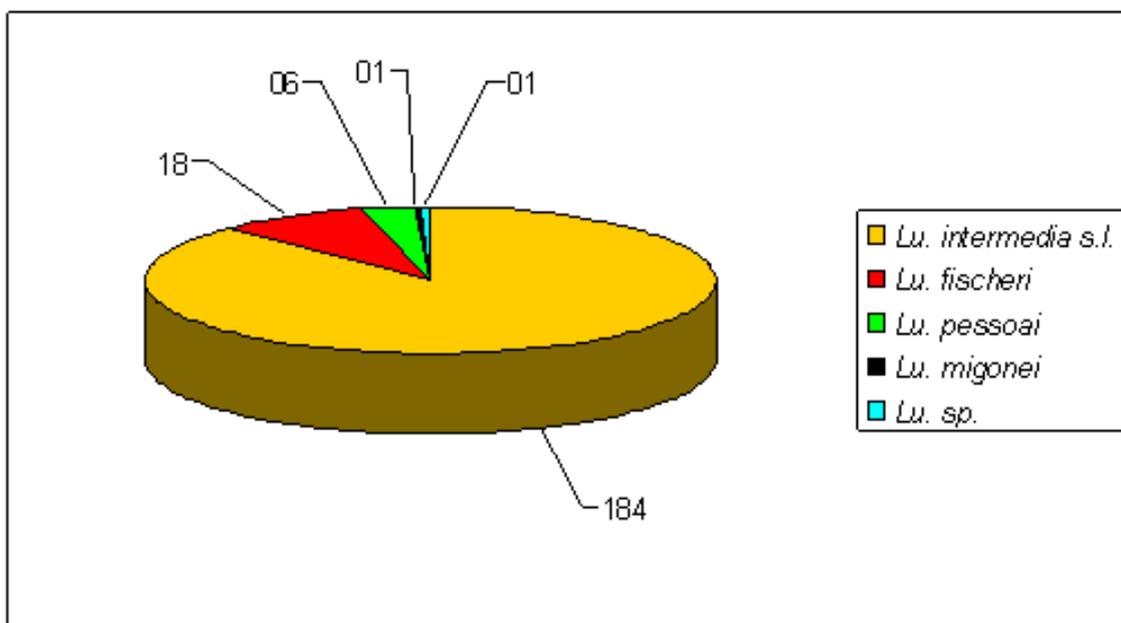


GRÁFICO 2 – NÚMERO DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL SEPARADOS SEGUNDO A ESPÉCIE

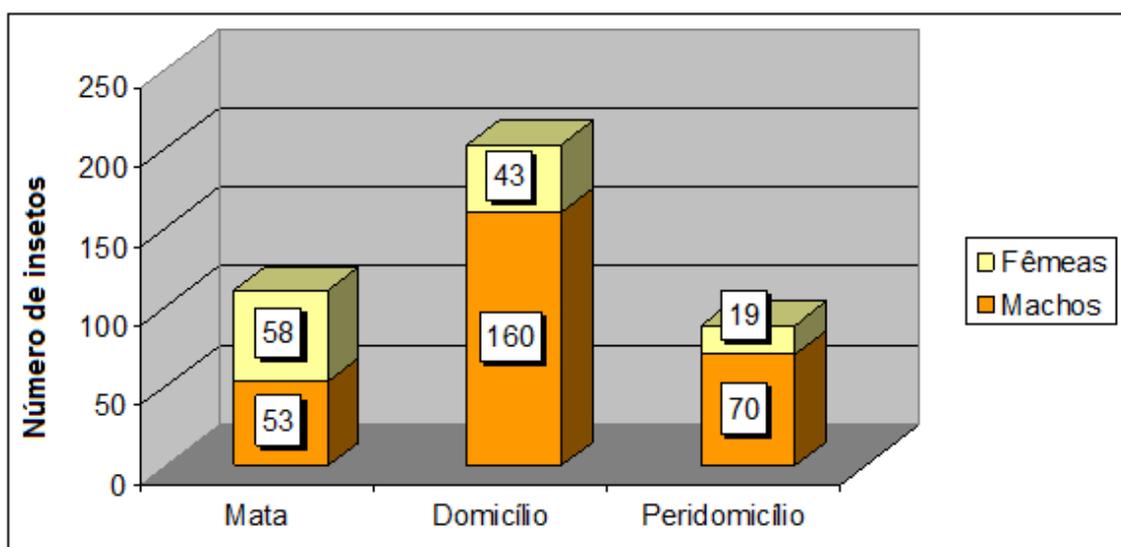


GRÁFICO 3 – NÚMERO DE INSETOS POR SEXO E ECÓTOPO DE *Lutzomyia intermedia s.l.* NO VALE DO RIBEIRA - PARANÁ

TABELA 5 – PERCENTUAL DE ESPÉCIMES DE *L. intermedia* s.l., *L. pessoai*, *L. fischeri*, *L. migonei* E *L. sp.* ENCONTRADOS NOS AMBIENTES DE COLETA DE CERRO AZUL E ADRIANÓPOLIS

	<i>L. intermedia</i> s.l.		<i>L. pessoai</i>		<i>L. fischeri</i>		<i>L. migonei</i>		<i>L. sp.</i>		Total	%
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F		
Mata	53	58	0	0	1	1	0	0	0	1	114	26,39
Peridomicílio	70	19	3	2	11	1	0	0	0	1	107	24,77
Domicílio	160	43	0	1	5	0	1	0	0	1	211	48,84
Total	283	120	3	3	17	2	1	0	0	3	432	
%	65,51	27,77	0,7	0,7	3,93	0,46	0,23	0	0	0,7		100

## 5.2 PESQUISA DE *Leishmania* NAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS

Das fêmeas coletadas neste trabalho, 10 espécimes de *L. intermedia*, estavam ingurgitadas, e um dos espécimes *Lutzomyia* sp. também era uma fêmea ingurgitada. Destas, cinco tiveram o sangue do seu tubo digestório inoculado em meio NNN, porém não houve crescimento de *Leishmania*. Todas as 128 fêmeas coletadas foram dissecadas, e também não foi encontrado o protozoário em seus tubos digestórios.

Durante a busca por flagelados no momento da dissecação, em quatro fêmeas de *L. intermedia* s.l., foi detectada a presença de espermatozoides em suas espermatecas. Também foram encontradas seis fêmeas contendo ovos, de pelo menos três espécies, distribuídos nos três ecótopos e nos dois municípios estudados. Em três destas fêmeas também foi encontrada a presença de sangue.

### 5.3 *Lutzomyia intermedia* s.s. X *Lutzomyia neivai*

No presente trabalho, todas as fêmeas capturadas pertencentes ao Complexo *L. intermedia*, cujas espermatecas possuíam número superior a 11 anéis, foram identificadas como *L. intermedia* s.s., as demais, foram identificadas como *L. intermedia* s.l., assim como todos os machos. Deste modo, de um total de 120 fêmeas capturadas deste Complexo, 106 foram de *L. intermedia* s.l. e 14 de *L. intermedia* s.s., ambas presentes nos diferentes ambientes de coleta (Gráfico 4). Das 14 fêmeas de *L. intermedia* s.s., 13 foram capturadas em Adrianópolis, e uma em Cerro Azul.

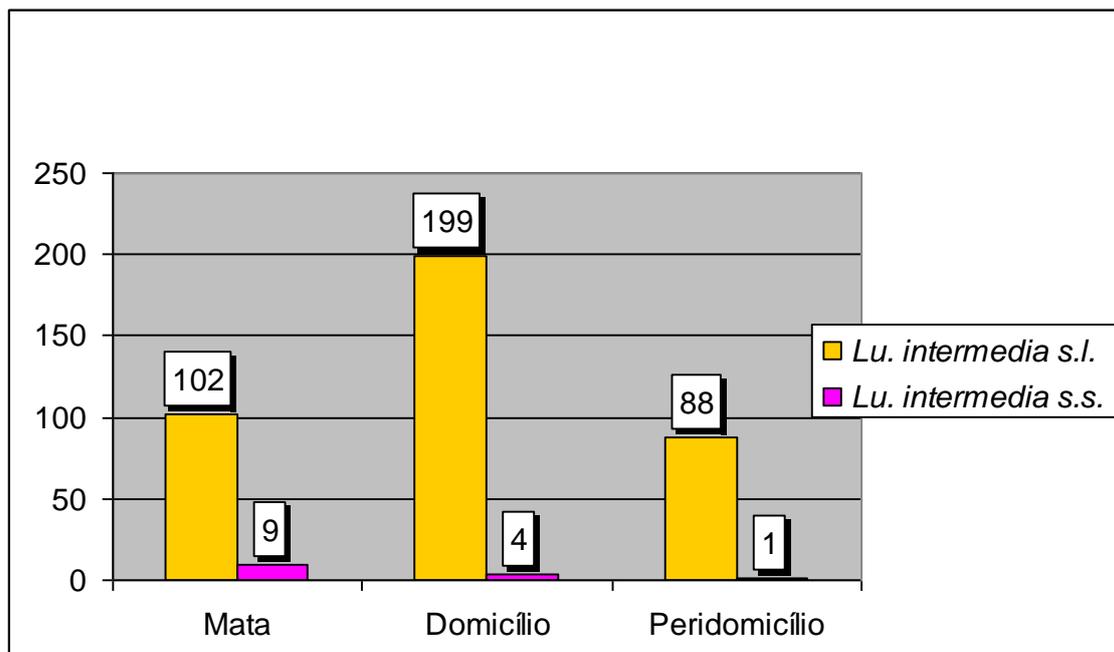


GRÁFICO 4 – NÚMERO DE INSETOS POR LINHAGEM E ECÓTOPO DE *Lutzomyia intermedia* NO VALE DO RIBEIRA – PARANÁ

#### 5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO

Uma amostragem de 56 indivíduos (Tabela 6) de diferentes ecótopos tiveram seu DNA amplificado pelos “primers” A10 e A2. Destes insetos, um grupo de 10 indivíduos também tiveram seu DNA amplificado pelos “primers” A3 e A9.

TABELA 6 – AMOSTRAS UTILIZADAS NA ANÁLISE MOLECULAR, POR PROCEDÊNCIA, ESPÉCIE, SEXO, CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO E GENÓTIPO. Legenda: a leitura da identificação das 50 primeiras amostras segue o esquema “município/ecótopo/ordem de identificação”, exemplos: CAD1: Cerro Azul Domicílio 1; ADM8: Adrianópolis Mata 8; CAP2: Cerro Azul Peridomicílio 2 (CONTINUA)

	Município	Ecótopo	Espécie	Sexo	Identificação	Genótipo
1	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD1	1
2	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD2	8
3	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD3	2
4	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD4	3
5	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD5	4
6	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD6	6
7	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD7	5
8	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD8	7
9	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD9	7
10	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAD10	7
11	Cerro Azul	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	F	CAM1	9
12	Cerro Azul	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	F	CAM2	10
13	Cerro Azul	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	F	CAM3	9
14	Cerro Azul	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	F	CAM4	12
15	Cerro Azul	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	F	CAM5	11
16	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM1	13
17	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM2	9
18	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM3	11
19	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM4	11
20	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM5	14
21	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM6	18
22	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM7	17
23	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM8	19
24	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM9	19
25	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM10	19
26	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM11	16
27	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM12	20
28	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM13	15
29	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM14	20
30	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADM15	20
31	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP1	22
32	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP2	26
33	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP3	27

TABELA 6 – AMOSTRAS UTILIZADAS NA ANÁLISE MOLECULAR, POR PROCEDÊNCIA, ESPÉCIE, SEXO, CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO E GENÓTIPO. Legenda: a leitura da identificação das 50 primeiras amostras segue o esquema “município/ecótopo/ordem de identificação”, exemplos: CAD1: Cerro Azul Domicílio 1; ADM8: Adrianópolis Mata 8; CAP2: Cerro Azul Peridomicílio 2 (CONCLUSÃO)

34	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP4	23
35	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP5	24
36	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP6	29
37	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP7	28
38	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP8	21
39	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP9	25
40	Adrianópolis	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	ADP10	30
41	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP1	33
42	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP2	34
43	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP3	38
44	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP4	37
45	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP5	35
46	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP6	39
47	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP7	31
48	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP8	32
49	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP9	40
50	Cerro Azul	Peridomicílio	<i>L. intermedia s.l.</i>	M	CAP10	36
51	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.s.</i>	F	L13I	
52	Adrianópolis	Mata	<i>L. intermedia s.s.</i>	F	L13II	
53	Cerro Azul	Domicílio	<i>L. pessoai</i>	F	LP	
54	Adrianópolis	Mata	<i>L. fischeri</i>	F	LF	
55	Mandaguari	Peridomicílio	<i>L. whitmani</i>	M	LW1	
56	Mandaguari	Domicílio	<i>L. whitmani</i>	F	LW2	

O perfil das amplificações foi analisado em grupos de 10 amostras de um mesmo tipo de ecótopo para cada iniciador. Por exemplo, 10 insetos da mata tiveram seu DNA amplificado com o “primer” A10 (Figura 9). Neste caso foram examinados cinco exemplares de cada município.

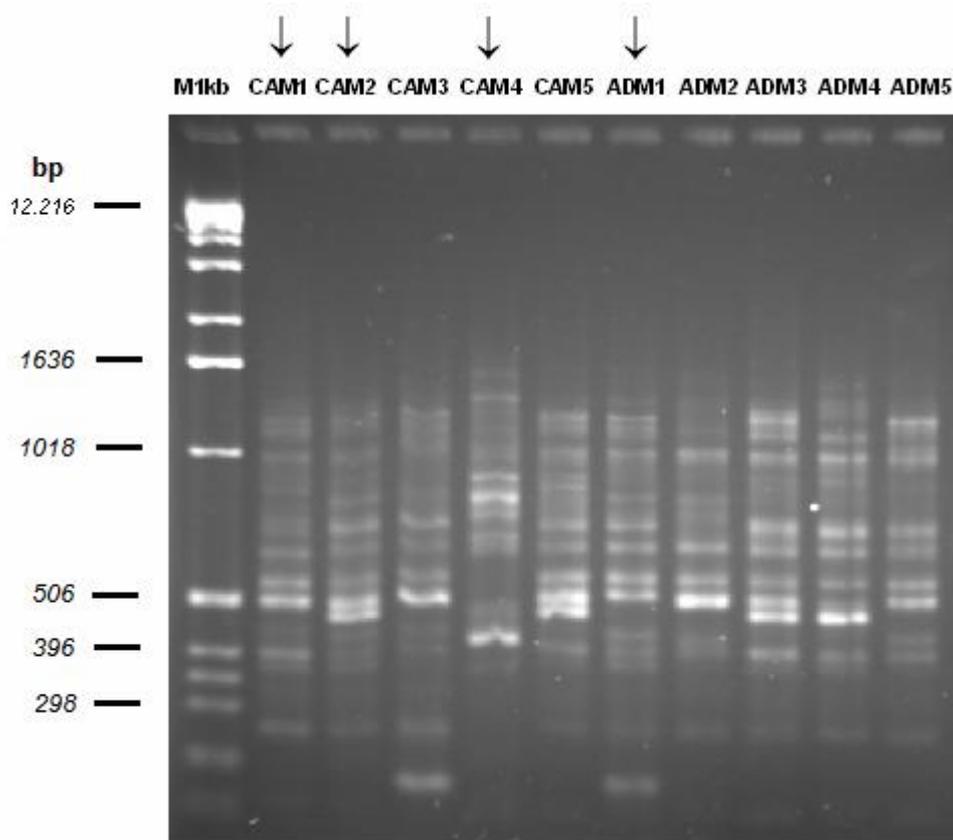


FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A10) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia s.l.* DE CERRO AZUL (CA) E ADRIANÓPOLIS (AD). LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; M: MATA. AS SETAS INDICAM AS AMOSTRAS ELEITAS PARA COMPOR O GEL DE ANÁLISE FINAL.

Para a análise realizada pelo programa NTSYS-pc 2.1, foi construída uma matriz binária a partir do perfil de bandas das amostras polimórficas amplificadas com o “primer” A10, que puderam ser visualizadas depois de uma nova eletroforese (Figura 10). Esta matriz serviu de base para a construção do dendrograma (Figura 14). A exemplo do gel da Figura 9, foram eleitas as amostras CAM1, CAM2, CAM4 e ADM1 para compor o gel de análise final; cada uma destas apresenta um perfil de bandas que pode ser único ou comum a outros indivíduos (Tabela 7):

TABELA 7 – AMOSTRAS AMPLIFICADAS PELO “PRIMER” A10 PRESENTES NO GEL DA FIGURA 9

Amostra eleita	Amostras representadas
CAM1	CAM3, ADM2
CAM2	CAM5, ADM3, ADM4
CAM4	
ADM1	ADM5

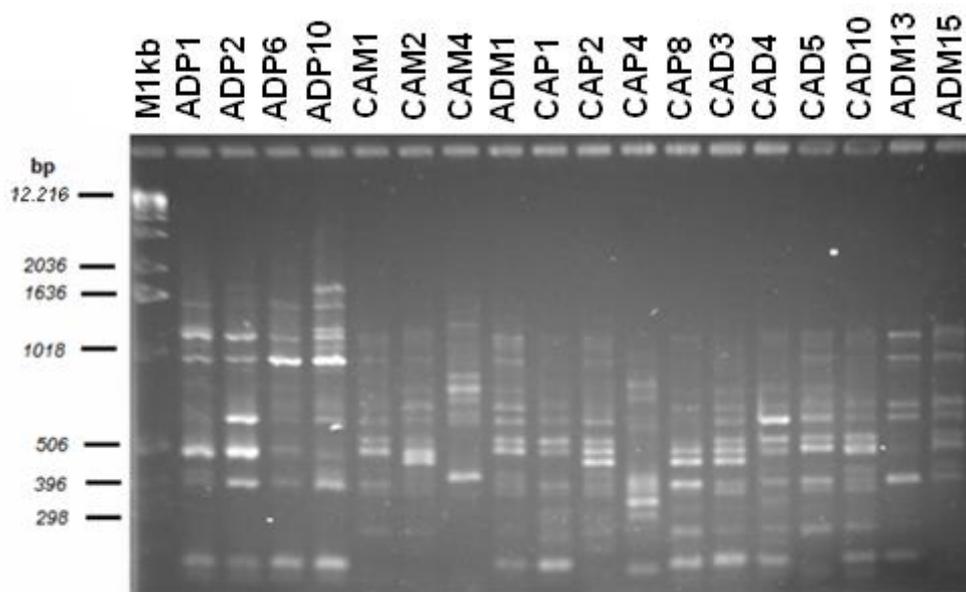


FIGURA 10 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A10) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia* s.l. DE CERRO AZUL (CA) E ADRIANÓPOLIS (AD). LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; P: PERIDOMICÍLIO; M: MATA; D: DOMICÍLIO.

O mesmo procedimento foi adotado quando o DNA dos flebotomíneos foi amplificado com o “primer” A2: eletroforeses com 10 amostras de diferentes ecótopos e escolha das polimórficas quando visualizados os perfis de bandas para o preparo de um novo gel, que serviu de modelo de análise para a construção da matriz e logo para o programa NTSYS-pc 2.1 gerar o dendrograma (Figura 16).

No caso do mesmo grupo de insetos provenientes da mata de Cerro Azul e Adrianópolis do gel da Figura 9, obteve-se o seguinte perfil de bandas com o “primer” A2 (Figura 11):

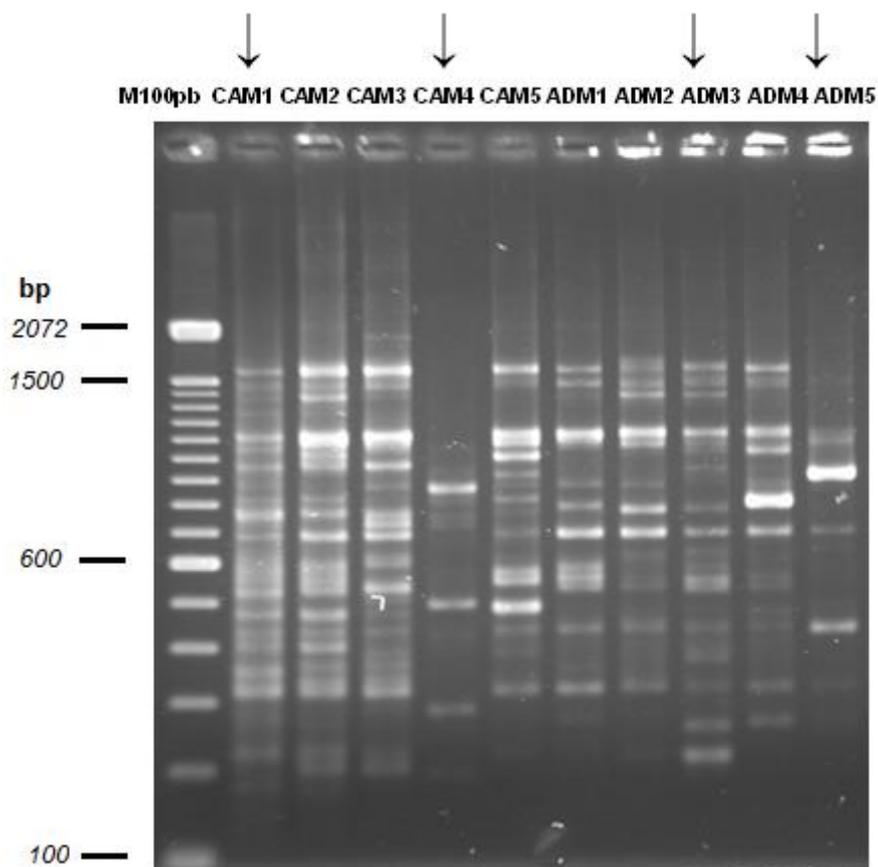


FIGURA 11: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A2) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia s.l.* DE CERRO AZUL (CA) E ADRIANÓPOLIS (AD). LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; M: MATA. AS SETAS INDICAM AS AMOSTRAS ELEITAS PARA COMPOR O GEL DE ANÁLISE FINAL.

Novamente as amostras polimórficas foram representadas para o preparo do gel de análise final, através da escolha de algumas amostras representativas de cada eletroforese realizada com o DNA amplificado com o “primer” A2. No caso do gel da Figura 11, as amostras eleitas e as representadas estão presentes na Tabela 8.

TABELA 8: AMOSTRAS PRESENTES NO GEL DA FIGURA 11

Amostra eleita	Amostras representadas
CAM1	CAM2, CAM3, ADM1, ADM2
CAM4	
ADM3	CAM5, ADM4
ADM5	

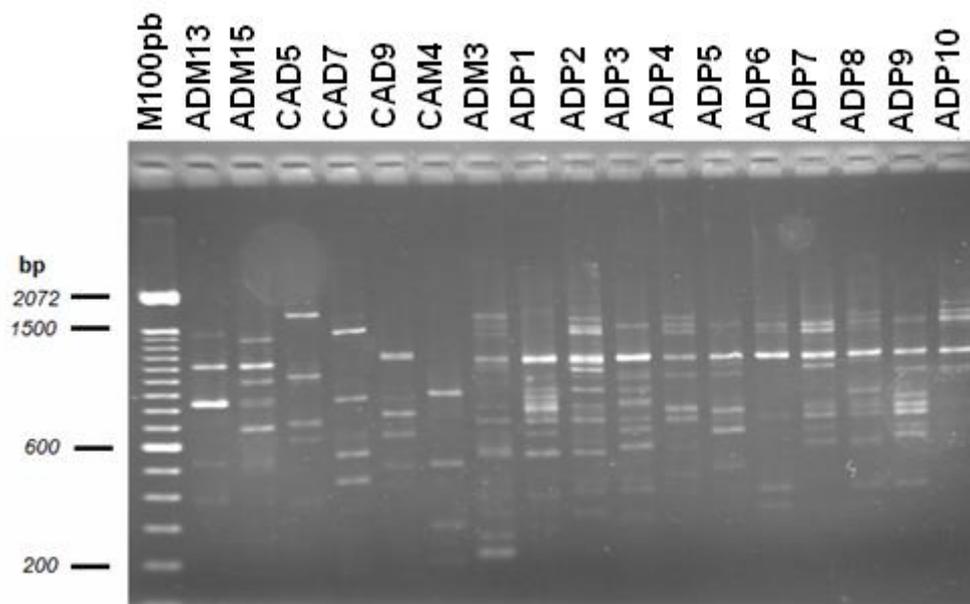


FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A2) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia s.l.* DE CERRO AZUL (CA) E ADRIANÓPOLIS (AD). LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; M: MATA; D: DOMICÍLIO; P: PERIDOMICÍLIO.

A análise dos agrupamentos feitos com todos os indivíduos submetidos ao RAPD permitiu que fosse reconhecido um perfil genético (aqui tratado como genótipo, para os marcadores escolhidos) para cada inseto estudado. Desta forma, como no caso do grupo dos insetos provenientes da mata de Cerro Azul e Adrianópolis apresentados anteriormente, pelo agrupamento ocorrido em função do perfil de bandas gerado por cada “primer”, reconheceram-se seis genótipos, sendo que CAM1, CAM3 e ADM2 apresentaram o mesmo genótipo (genótipo 9), assim como CAM5, ADM3 e ADM4 (genótipo 11). O fato destas amostras apresentarem o mesmo genótipo deve-se ao agrupamento em comum que ambas tiveram quando da análise dos seus perfis de bandas, tanto para o “primer” A10, quanto para o A2 (Tabelas 7 e 8). Pelo “primer” A10, foi possível identificar 22 perfis, enquanto o “primer” A2 permitiu a identificação de 33 perfis.

No total, foram identificados 40 genótipos dentro da população de *L. intermedia s.l.* estudada, dentre os 50 insetos analisados dos três ecótopos e dos dois municípios.

No caso das cinco fêmeas de *L. intermedia s.l.* submetidas ao RAPD, pela análise dos genótipos identificados, não houve relação entre os mesmos e o número de anéis na espermateca. CAM1 e CAM3 apresentaram o mesmo genótipo (genótipo 9), porém CAM1 apresentou oito anéis na sua espermateca, e CAM3, nove. Já CAM2 (10 anéis na espermateca), CAM5 (nove anéis) e CAM4 (sete anéis) apresentaram, respectivamente, os genótipos 10, 11 e 12. Deste modo, os “primers” utilizados não geraram genótipos que guardassem relação com marcadores morfológicos em *L. intermedia s.l.*

#### 5.4.1 Análise fenética pelos “primers” A10 e A2

Os espécimes pertencentes às espécies *L. fischeri*, *L. pessoai*, *L. whitmani* e os dois exemplares da linhagem *L. intermedia s.s.* tiveram seu DNA amplificado com os “primers” A10 e A2, os quais estão representados no gel da Figura 13.

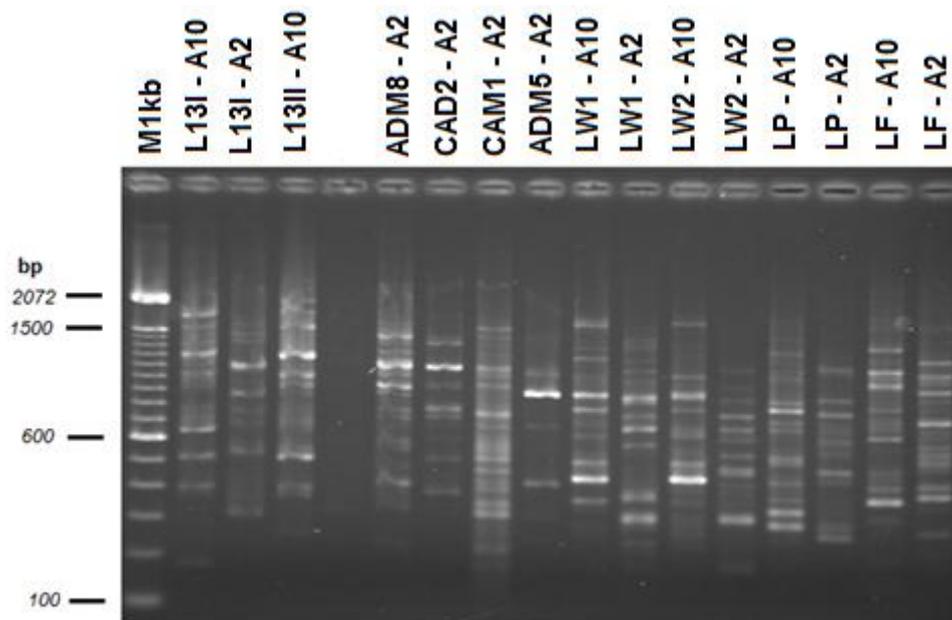


FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE EXEMPLARES DE *L. intermedia s.l.* DE CERRO AZUL (CA) E ADRIANÓPOLIS (AD). LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB; M: MATA; D: DOMICÍLIO; P: PERIDOMICÍLIO; L13I: *L. intermedia s.s.* 1; L13II: *L. intermedia s.s.* 2; LW1: *L. whitmani* 1; LW2: *L. whitmani* 2; LP: *L. pessoai*; LF: *L. fischeri*. AS DESIGNAÇÕES APÓS OS CÓDIGOS – A10 E A2 – REFEREM-SE AOS “PRIMERS” UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO.

A grande diversidade genotípica da população de *L. intermedia s.l.* estudada é revelada não apenas pela quantidade de genótipos identificados, mas também pela análise do dendrograma gerado através da matriz construída a partir dos perfis de bandas do DNA amplificado com o “primer” A10 (Figura 14).

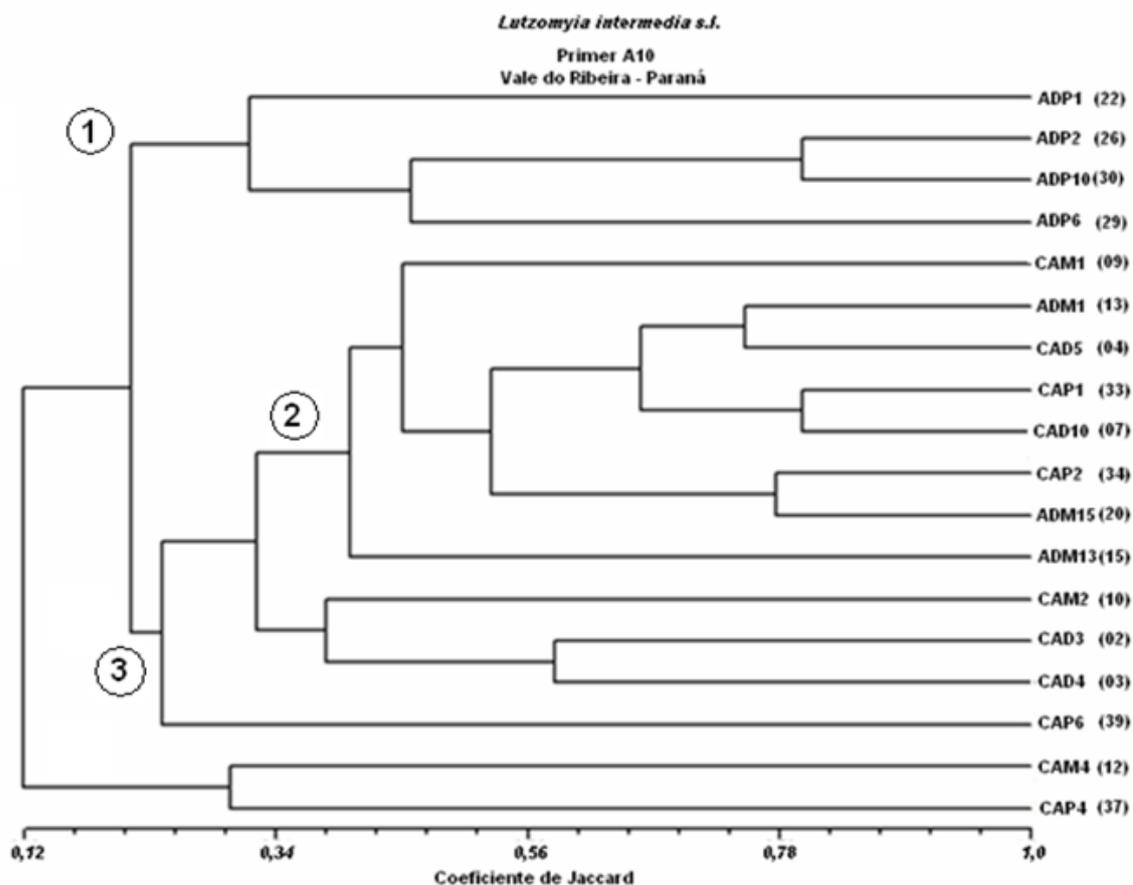


FIGURA 14 - DENDROGRAMA DOS EXEMPLARES DE *L. intermedia s.l.* GERADO PELO PROGRAMA NTSYS-PC 2.1 COM AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DE UPGMA E COEFICIENTE DE DISTÂNCIA DE JACCARD, A PARTIR DE ELETROFORESE DE RAPD REALIZADO COM INICIADOR A10. OS NÚMEROS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O GENÓTIPO DA AMOSTRA, E OS NO INTERIOR DOS CÍRCULOS, OS PRINCIPAIS AGRUPAMENTOS FORMADOS.

O dendrograma gerado demonstrou diferentes graus de similaridade, variando de acordo com o Coeficiente de Jaccard de 30 a 80% para um mesmo ecótopo, o que indica haver polimorfismo intra-específico e também a possibilidade de fluxo gênico entre as populações estudadas.

O RAPD com o “primer” A10 também foi útil para discriminar insetos da mesma espécie ou subgênero (Figura 15). Este dendrograma também foi gerado através de matriz construída a partir dos perfis de bandas constantes no gel da Figura 13.

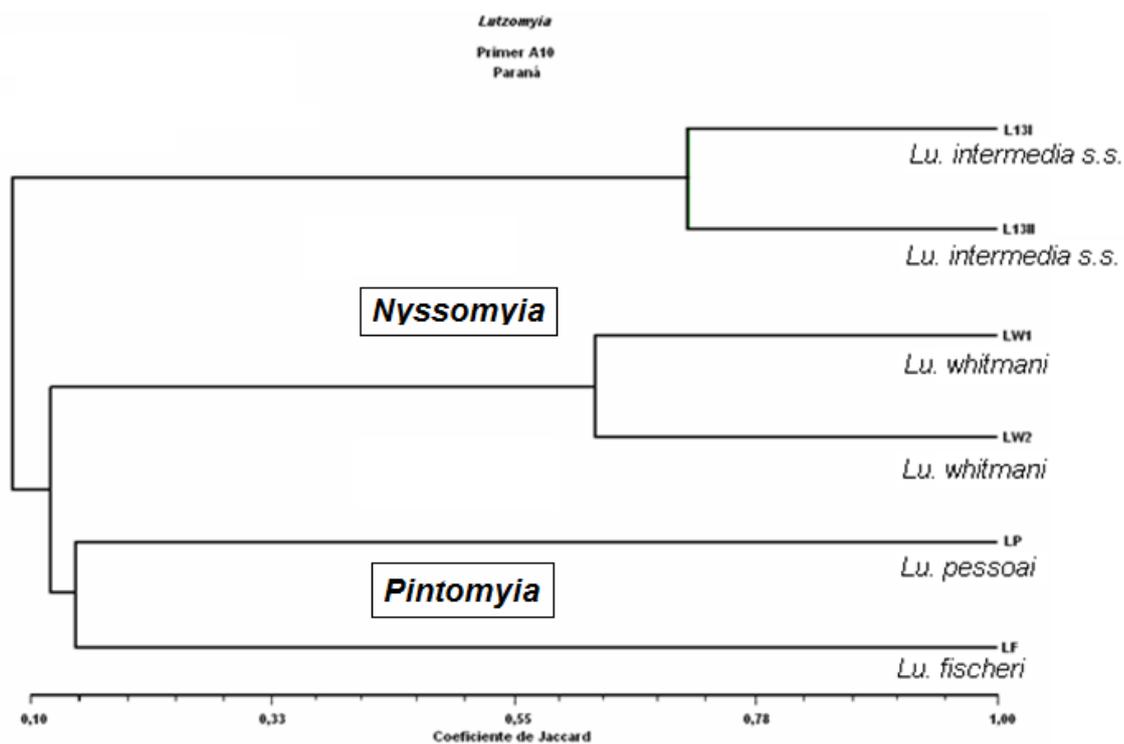


FIGURA 15 - DENDROGRAMA DOS EXEMPLARES DO GÊNERO *Lutzomyia* GERADO PELO PROGRAMA NTSYS-PC 2.1 COM AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DE UPGMA E COEFICIENTE DE DISTÂNCIA DE JACCARD, A PARTIR DE ELETROFORESE DE RAPD REALIZADO COM INICIADOR A10.

Já o “primer” A2 permitiu que o dendrograma construído (Figura 16) agrupasse os flebotomíneos preferentemente conforme o ambiente de coleta e município.

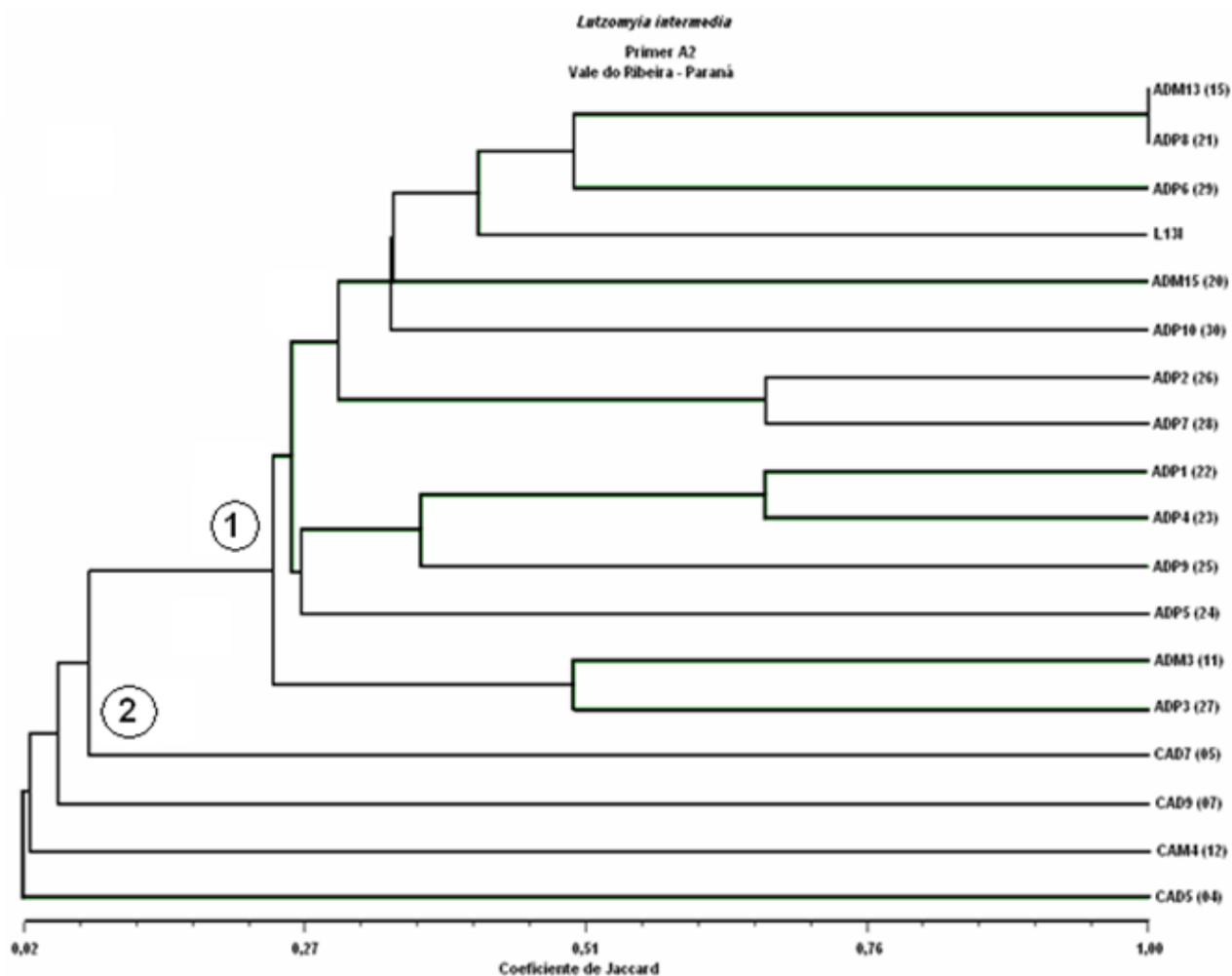


FIGURA 16 - DENDROGRAMA DOS EXEMPLARES DE *L. intermedia* GERADO PELO PROGRAMA NTSYS-PC 2.1 COM AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DE UPGMA E COEFICIENTE DE DISTÂNCIA DE JACCARD, A PARTIR DE ELETROFORESE DE RAPD REALIZADO COM INICIADOR A2. OS NÚMEROS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O GENÓTIPO DA AMOSTRA, E OS NO INTERIOR DOS CÍRCULOS, OS PRINCIPAIS AGRUPAMENTOS FORMADOS.

Pela análise do dendrograma, os insetos provenientes de Cerro Azul formaram um agrupamento, e os de Adrianópolis outro agrupamento. A amostra L13I é um inseto pertencente à linhagem *L. intermedia* s.s e é uma fêmea coletada na mata de Adrianópolis, e foi agrupada juntamente com outros três insetos também de Adrianópolis (dois coletados no peridomicílio e outro na mata).

L13I foi agrupado juntamente com os insetos pertencentes à linhagem *L. intermedia* s.l. Este resultado ratifica a condição de uma única espécie existente para ambas as linhagens.

A diversidade genotípica em função do ecótopo pode ser ilustrada pela Tabela 9.

TABELA 9: NÚMERO TOTAL DE GENÓTIPOS OBTIDOS PELO RAPD DE *L. intermedia* s.l. DOS TRÊS DIFERENTES ECÓTOPOS NOS MUNICÍPIOS DE CERRO AZUL E ADRIANÓPOLIS

	Ecótopos		
	Domicílio	Peridomicílio	Mata
Número de genótipos	8	20	12
Número de insetos que possuem os genótipos	10	20	20

O peridomicílio foi o ecótopo que apresentou a maior diversidade genotípica.

#### 5.4.2 Análise pelos “primers” A3 e A9

Além dos “primers” A10 e A2, foram utilizados ainda os iniciadores A3 e A9, para um grupo de insetos do peridomicílio de Adrianópolis. Comparados com os primeiros, estes marcadores geraram um pequeno número de fragmentos, com perfis em geral contendo 3 bandas.

No caso do gel da Figura 17 (“primer” A3) é possível observar uma banda de considerável intensidade, entre 400 e 500 pb, que está presente na maioria dos indivíduos do grupo.

Da mesma forma, os perfis de amplificação pelo “primer” A9 (Figura 18) geraram uma banda característica para a maioria dos espécimes, com peso molecular entre 400 e 500 pb.

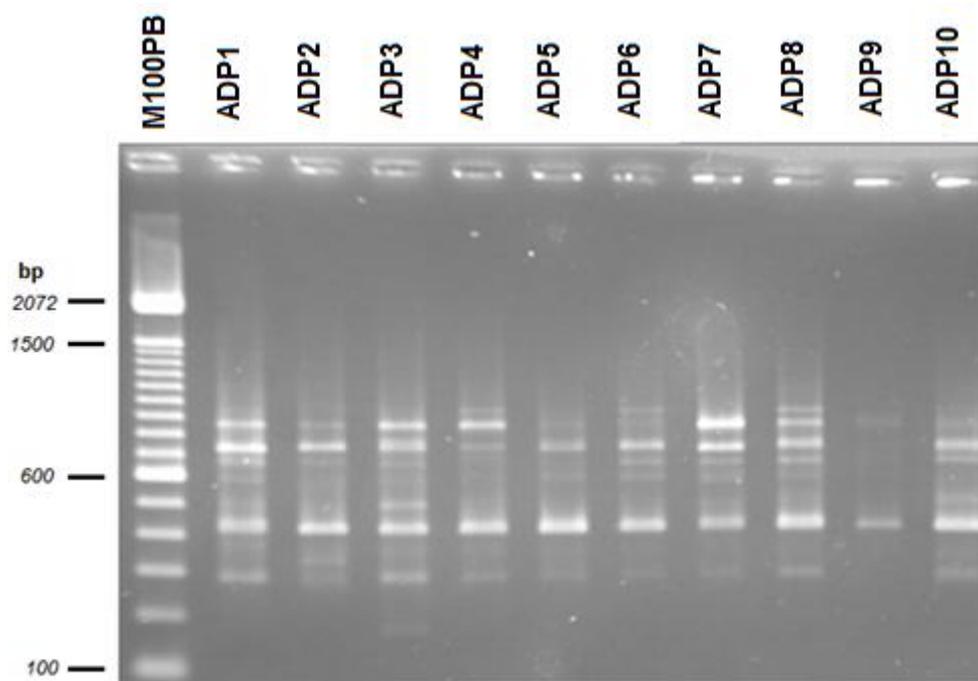


FIGURA 17 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A3) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia* s.l. DO PERIDOMICÍLIO DE ADRIANÓPOLIS. LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB.

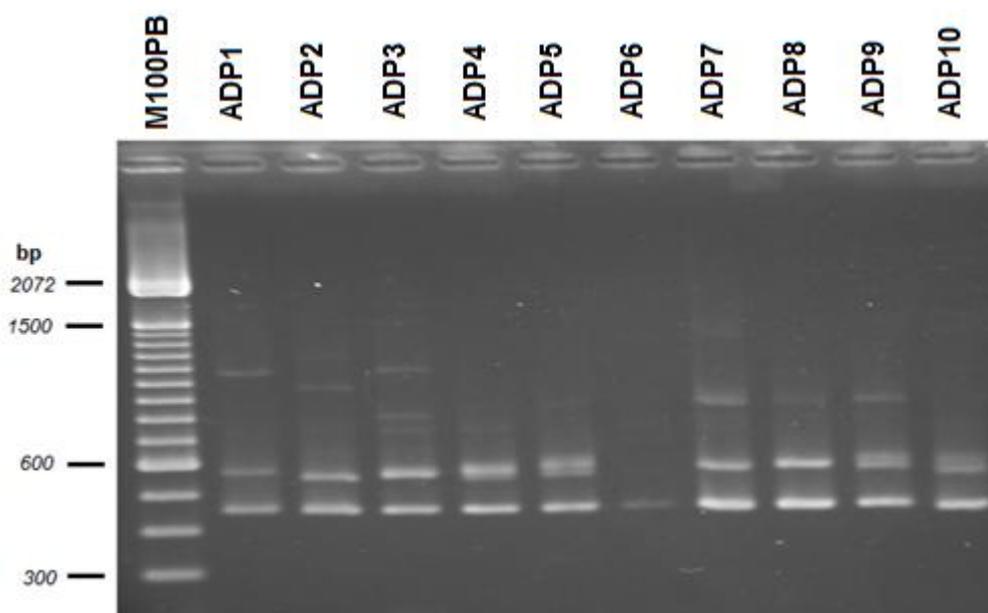


FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (INICIADOR A9) DE EXEMPLARES DE *L. intermedia* s.l. DO PERIDOMICÍLIO DE ADRIANÓPOLIS. LEGENDA: M1KB: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB.

## 6 DISCUSSÃO

Responsáveis pela captura dos flebotomíneos, as armadilhas CDC foram inicialmente desenvolvidas para a coleta de culicídeos (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962). Estas armadilhas são largamente usadas para a captura de flebotomíneos. Sua vantagem é que os insetos podem ser transportados vivos para o laboratório, uma vez que o corpo da armadilha está acoplado a uma gaiola de manutenção dos mesmos (BARRAUD, 1929). Esta condição favorece não só a posterior dissecação das fêmeas, na tentativa de encontrar o protozoário *Leishmania*, como também o estabelecimento de colônias.

*Lutzomyia fischeri* foi a segunda espécie mais coletada no presente trabalho, com 17 machos coletados e duas fêmeas (uma capturada na mata e outra no peridomicílio); a maioria dos machos (11) foi capturada no peridomicílio (Tabela 5). De acordo com FORATTINI (1973), esta espécie é habitante preferencial de ambientes cobertos de vegetação de menor porte, como capoeiras e matas de segunda formação, sendo que nestes ambientes pode ser responsabilizada por manter o foco natural de *Leishmania* (LAINSON, 1983). Estas características aplicam-se à paisagem de Adrianópolis onde as coletas foram realizadas, em que uma das fêmeas foi coletada em ambiente de mata (do tipo secundária). CASTRO *et al.* (2005) também encontraram *L. fischeri* em Adrianópolis (três machos e 15 fêmeas), e neste mesmo município, SANTOS *et al.* (2009) encontraram 11 exemplares e no município de Tunas do Paraná (também do Vale do Ribeira), um exemplar. Segundo BARRETTO (1943), esta espécie também pode ser encontrada realizando o repasto sanguíneo durante o dia. Apesar de nunca ter sido encontrado naturalmente infectado com *Leishmania*, por apresentar apreciável grau de antropofilia, embora possa praticar hematofagia em animais domésticos, e pela sua abundância em áreas desmatadas com ocorrências de LTA, COUTINHO & BARRETTO (1941) também admitiram que *L. fischeri* poderia atuar como vetor. A hipótese de que *L. fischeri* também poderia atuar como vetor (secundário) de *Leishmania* no Vale do Ribeira do Paraná não pode ser descartada, uma vez que esta também é uma região de área degradada.

A espécie *L. pessoai* foi a terceira mais coletada, com 3 machos capturados no peridomicílio, 2 fêmeas capturadas no peridomicílio e 1 fêmea no domicílio (Tabela 5). *Lutzomyia pessoai* é tido como um flebotomíneo de hábitos essencialmente silvestres, vivendo em matas úmidas onde pode ser observado praticamente durante todo o ano. É uma espécie altamente antropofílica nas regiões onde foi estudada, sendo comum a captura com isca humana. Sua atividade é predominantemente crepuscular e noturna (BARRETTO, 1943; FORATTINI, 1954). A freqüência aos domicílios foi observada no Estado de São Paulo por BARRETTO (1943) e FORATTINI (1954), que, respectivamente, verificaram a invasão de casas situadas até 150 e 300 metros das matas. O fato de apresentar alta densidade, antropofilia e freqüência aos domicílios nas regiões endêmicas de LTA, além da observação de formas em leptomonas (que poderiam ser *Leishmania*) presentes na região buco-faringeana do inseto, aponta para a competência vetorial desta espécie (COUTINHO, 1940; PESSÔA & COUTINHO, 1941).

Apenas um indivíduo representante da espécie *L. migonei* foi coletado, que foi um macho, no domicílio de Cerro Azul. É comumente encontrada em abrigos de animais domésticos situados próximos às matas e capoeiras, sendo relatada sua freqüência nos domicílios (BARRETTO, 1943; PIFANO *et al.*, 1962). Em suas observações no Vale do Ribeira paranaense, CASTRO *et al.* (2005) encontraram em Adrianópolis 45 exemplares desta espécie (34 machos e 11 fêmeas), enquanto que SANTOS *et al.* (2009) relataram o encontro de 67 exemplares em Adrianópolis e três em Tunas do Paraná. Quanto às suas preferências alimentares, é dotado de grande antropofilia, sugando também animais domésticos como cães e galinhas (BARRETTO, 1943, RANGEL *et al.*, 1986). Também carrega o *status* de possível transmissora de *Leishmania*, pois além da acentuada antropofilia e sua incidência coincidir com características análogas da LTA, foi encontrado naturalmente infectando o seu tubo digestório aquele protozoário (PESSÔA & COUTINHO, 1941; BARRETTO, 1943). NIEVES & PIMENTA (2002), analisando a infecção experimental de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em *L. migonei*, a partir de alimentação com sangue de seres humanos, animais domésticos e silvestres, obtiveram o desenvolvimento dos protozoários no intestino desta espécie de flebotomíneo, com as fontes sanguíneas influenciando a taxa de infecção dos insetos. Para

ambas as espécies de *Leishmania*, a mais alta densidade parasitária foi obtida com o sangue de ratos silvestres, seguido do de *Didelphis*, humanos e eqüinos.

Em suas observações sobre o comportamento de flebotomíneos, GOMES *et al.* (1986) assinalam que as baixas densidades de populações de *L. fischeri* e *L. migonei* no Vale do Ribeira de São Paulo, podem indicar pouca capacidade destas espécies para vencerem as barreiras impostas pelo ambiente artificial. Entretanto, a participação destas espécies no ciclo de transmissão de *Leishmania* aos seres humanos deve ser considerada, especialmente quando da entrada dos mesmos em ambientes silvestres.

A alta prevalência de *L. intermedia s.l.* e o baixo número encontrado de flebotomíneos pertencentes às demais espécies, vão de encontro com os números obtidos em outros estudos realizados no Vale do Ribeira (GOMES *et al.*, 1986; CONDINO *et al.*, 1998; DOMINGOS *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

Na tentativa de determinar o vetor de *Leishmania* no Vale do Ribeira (Paraná), CASTRO *et al.* (2005) coletaram flebotomíneos em Adrianópolis. Na localidade de Laranjal, a única espécie observada foi *L. intermedia*, registrando um total de 2.075 machos e 1.650 fêmeas. Na localidade de Perau, ainda em Adrianópolis, dos 1.493 flebotomíneos coletados, 1.367 foram *L. intermedia* (487 machos e 880 fêmeas).

Em levantamento realizado por SILVA *et al.* (2008) em 37 municípios do Paraná, a espécie *L. intermedia s.l.* foi a mais freqüente e abundante, representando 75,6% dos flebotomíneos coletados. Neste mesmo levantamento, os autores encontraram a predominância de 98,7% de *L. intermedia s.l.* entre os flebotomíneos coletados em Adrianópolis.

Em suas observações realizadas no município de Pedro de Toledo (região do Vale do Ribeira, SP), DOMINGOS *et al.* (1998) verificaram a nítida predominância de *L. intermedia* tanto no ambiente domiciliar (98,7%) como no florestal em relação às demais espécies, com maior densidade no primeiro.

Neste trabalho, a espécie *L. intermedia s.l.* (machos e fêmeas) foi encontrada nos três ambientes (domicílio, peridomicílio e mata) em Cerro Azul e Adrianópolis, com predomínio no ambiente domiciliar (46,99% do total de insetos coletados). No entanto, a maior parte das fêmeas coletadas foi na mata – 58 exemplares (48,33% das fêmeas de *L. intermedia s.l.*) (Gráfico 3) – o que

sugere que neste ambiente pode haver transmissão de *Leishmania*, quando se considera que é na mata que os mamíferos reservatórios vivem. Esta condição de transmissão foi relatada por CASTRO *et al.* (2005) para a região, onde a infecção foi correlacionada com os hábitos da população de adentrar na mata para atividades de caça ou pesca, entre outras.

Apesar da baixa densidade populacional humana, a região do Vale do Ribeira no estado do Paraná foi muito degradada. Após a destruição da floresta primária, existem resíduos de floresta secundária, com cultivo de banana, feijão, arroz, milho e mandioca. Em algumas áreas, a floresta foi substituída por plantio de *Pinus ellioti* (CASTRO *et al.*, 2005). Esta situação tem sido a mesma em várias áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar de outros estados do Brasil, tais como São Paulo (GOMES *et al.*, 1992; TOLEZANO, 1994); Rio de Janeiro (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1988) e Minas Gerais (HERMETO *et al.*, 1994).

GOMES *et al.* (1986), estudando aspectos ecológicos da LTA no Vale do Ribeira (SP) incriminaram *L. intermedia* como única espécie potencialmente vetora de *Leishmania*, dada a sua densidade nas capturas realizadas. Neste estudo, os autores relacionaram a transmissão da zoonose não com o movimento da população humana para o interior da floresta, e sim com as circunstâncias de dispersão dos vetores para as residências. Estas observações levam à hipótese de que a *Leishmania* pode dispersar-se para além das fronteiras dos focos naturais, desencadeando ciclos biológicos secundários, no qual o ser humano torna-se suscetível, graças ao sucesso ecológico de *L. intermedia*.

GOMES & GALATI (1989) assinalaram que na região do Vale do Ribeira, a transmissão humana da LTA ocorre em ambiente extraflorestal (rural e periurbano), e é relacionada com o papel vetorial de *L. intermedia*, e conforme já reportado por FORATTINI, *et al.* (1976), em suas observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo.

A região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, foi conservada durante décadas, até mesmo nos períodos de maiores desflorestamentos, ainda que ciclos naturais de *L. braziliensis* transcorressem dentro das florestas. Contudo, a alteração para área endêmica foi recente e coincide com o aparecimento de *L. intermedia* no ambiente domiciliar situado em zona rural

(SILVA & GOMES, 2001). Nesta região, a LTA manifestou-se endemicamente, após décadas de colonização humana, quando não mais existia a floresta primária nos níveis topográficos mais baixos. Não há evidências do padrão clássico de transmissão relacionado com colonização recente e desflorestamento, o que talvez possa ser explicado pela precariedade de condições favoráveis à transmissão de LTA aos humanos, na floresta perenifolia higrófila do Sistema da Serra do Mar, sugerindo que a transmissão ocorra no ambiente extraflorestal (DOMINGOS *et al.*, 1998).

GOMES & GALATI (1989) chamam a atenção para o fato de a devastação florestal ter influência sobre a posição de *L. intermedia* na composição da fauna flebotomínica de diversas áreas. Isto porque, quando o ambiente florestal permanece inalterado, esta espécie é capturada quase acidentalmente, porém com o desflorestamento ela passa à condição de dominância quase absoluta.

Considerando o potencial que apresenta *L. intermedia* como vetor de *Leishmania*, e também considerando o potencial vetorial das outras espécies, ficou evidente que a busca pelo protozoário nas fêmeas destes flebotomíneos tornou-se uma estratégia importante para se elucidar o circuito de transmissão da LTA na região do Vale do Ribeira do Paraná.

A despeito do encontro de baixo número de fêmeas encontradas ingurgitadas, o não encontro de insetos parasitados por *Leishmania* não é fato incomum em pesquisas cujo objetivo é encontrar o protozoário não só a partir de flebotomíneos como também de mamíferos silvestres suspeitos de serem considerados reservatórios (GOMES *et al.*, 1990; CASTRO *et al.*, 2005). Estas condições sugerem a existência de uma baixa pressão parasitária no circuito de transmissão de *L. braziliensis* na região do Vale do Ribeira paranaense.

Considerando o papel vetorial de *L. whitmani* e *L. intermedia*, com base na interação flebotomíneo-*Leishmania*, SOARES *et al.* (2010) analisaram o potencial de ligação das moléculas de lipofosfoglicana (LPG), presentes na superfície dos protozoários, ao epitélio intestinal dos insetos. Os autores verificaram um potencial de adesão dos flagelados ao intestino de *L. whitmani* 11 vezes maior que no de *L. intermedia*, o que sugere uma maior susceptibilidade da primeira espécie em se encontrar parasitada. Em trabalho envolvendo a busca de fêmeas de flebotomíneos infectadas, no norte do

Paraná, LUZ *et al.* (2000) encontraram *Leishmania* no intestino de três fêmeas de *L. whitmani*.

A busca pelos protozoários a partir da dissecação de fêmeas é contrastada com estudos onde a detecção de *Leishmania* é feita por métodos moleculares. PITA-PEREIRA *et al.* (2008), a fim de identificar exemplares de *Lutzomyia* naturalmente infectados por *Leishmania*, provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral em Corumbá (Mato Grosso do Sul, Brasil), utilizaram PCR-Multiplex. Resultados positivos para *L. infantum* foram obtidos a partir de *Lutzomyia cruzi* (taxa de infecção de 1,5%) e *Lutzomyia forattinii* (taxa de infecção de 0,7%). PITA-PEREIRA *et al.* (2009) também utilizaram PCR-Multiplex para detectar infecção de *Leishmania*, em exemplares de *L. intermedia s.l.*, coletados em área endêmica de LTA em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), encontrando uma taxa estimada de infecção de 1,1%.

Tal como acontece com outros dípteros, ocorre nos flebotomíneos a chamada concordância gonotrófica: a realização de um repasto sanguíneo completo é necessária para que se complete o ciclo gonotrófico, que se inicia com a procura e obtenção da refeição sanguínea, continuando-se com a digestão e maturação dos ovos (FORATTINI, 1973). Assim, no presente trabalho, pode-se admitir que as fêmeas onde ovos foram encontrados, já realizaram repasto(s) sanguíneo(s) completo(s).

Nas coletas realizadas, em três fêmeas onde foi observada a presença de ovos, havia também a presença de sangue, todas pertencentes à espécie *L. intermedia s.l.* De acordo com as observações de BARRETTO (1943), fêmeas com hábitos mais domiciliares, como *L. intermedia* e *L. fischeri*, morrem em menor proporção após a desova, em relação a outras espécies, o que pode indicar que em condições naturais parte dos indivíduos sobrevivem à postura, e portanto, continuam aptos a nova reprodução, e por conseguinte, novo repasto, o que em epidemiologia significa uma maior probabilidade de transmissão de *Leishmania*. Estes dados convergem também com os resultados obtidos por GOMES *et al.* (1982), que em suas observações sobre alimentação e reprodução de *L. intermedia*, comprovaram que esta espécie pode realizar mais de um repasto sanguíneo, seja após a oviposição completa, seja após a incompleta, o que viabiliza sua incriminação como vetora de *Leishmania*.

Também foram encontradas quatro fêmeas de *L. intermedia* s.l. contendo espermatozoides em suas espermatecas. Entre os possíveis fatores que precedem o acasalamento, um dos mais importantes é a liberação do feromônio sexual masculino para atrair as fêmeas da mesma espécie. Admite-se que as cópulas ocorram no período noturno, quando os flebotomíneos estão mais ativos na procura de hospedeiros para sugar sangue (WARD *et al.*, 1989).

Tradicionalmente, a diferenciação inter-específica em flebotomíneos, é realizada com base na análise de caracteres morfológicos. Em especial, o cibário e espermateca, no caso das fêmeas, e aspectos do aparelho genital masculino, no caso dos machos.

A grande maioria das fêmeas coletadas (13) de *L. intermedia* s.s. é oriunda de Adrianópolis, enquanto apenas uma fêmea foi coletada em Cerro Azul. Na distribuição geográfica de *L. intermedia* definida por MARCONDES *et al.* (1998), não foi apontada a ocorrência de *L. intermedia* s.s. no Vale do Ribeira do Paraná, e que esta linhagem estaria presente no Vale do Ribeira paulista, ocorrendo em simpatria com *L. neivai* em Pariquera-Açu. ANDRADE-FILHO *et al.* (2007) assinalam que, além de Pariquera-Açu, as duas linhagens estão em simpatria também em outras áreas do Vale do Ribeira de São Paulo: Iporanga, Barra do Turvo, Eldorado, Itariri, Juquiá e Pedro de Toledo.

Já em levantamento realizado por SANTOS *et al.* (2009) no Vale do Ribeira paranaense, houve o encontro de um único exemplar de *L. intermedia* s.s. (uma fêmea) para 4.649 exemplares de *L. neivai*, em Adrianópolis. Para explicar a baixa incidência de *L. intermedia* s.s. nestas áreas, os autores citam MARCONDES *et al.* (1998), os quais referem que *L. intermedia* s.s. tem sido encontrada em áreas mais quentes e úmidas que as de *L. neivai*, e que esta linhagem parece estar mais adaptada que a primeira a regiões de latitude e altitude maiores, de clima mais frio e seco, como as do interior do Estado de São Paulo. No entanto, os autores não explicam o motivo de insetos coletados pertencentes a espécies que não tomam parte do Complexo *L. intermedia*, tais como *L. migonei* e *L. fischeri*, terem sido mais numerosos que a própria *L. intermedia* s.s., ainda mais quando se considera que estas espécies pertencem a categorias supra-específicas diferentes das do Complexo *L. intermedia* e ocupam nichos ecológicos distintos.

De acordo com FELICIANGELI (1987), a composição específica de uma população de insetos descreve as espécies entre si e a população dentro de uma área limitada em particular ou habitat, podendo ser influenciada pela resultante das condições geográficas, meteorológicas e microclimáticas, do tipo de solo e vegetação presente em determinada área. Deste modo, similaridade dentro da composição específica, pode ser esperada em lugares que possuam condições similares, utilizando métodos de coletas iguais.

Estudos sobre estratificação de flebotomíneos apontam para uma homogeneidade quanto à frequência de espécimes pertencentes a um mesmo gênero ou subgênero frente a uma condição em especial: indivíduos do subgênero *Psathyromyia* são raramente atraídos por armadilhas luminosas CDC (BARRETT, 1993; DIAS-LIMA *et al.*, 2002); espécies do subgênero *Psychodopygus* na região amazônica predominam ao nível do solo, enquanto espécies de outros subgêneros são abundantes na copa das árvores (ARIAS & FREITAS, 1982; READY *et al.*, 1986).

Os números obtidos pelas coletas realizadas neste estudo indicam um equilíbrio quando se considera que *L. intermedia* s.s. e *L. neivai* pertençam a uma mesma categoria específica, pois juntos formam a população dominante do Vale do Ribeira, superando os integrantes do subgênero *Pintomyia* e do grupo *migonei*. Quando se considera as demais categorias isoladamente, elas também apresentam um equilíbrio, tal como ocorre com o subgênero *Pintomyia*, com 19 representantes da espécie *L. fischeri* para seis da espécie *L. pessoai*, numa relação aproximada de três para um, e sendo que ambas predominaram no peridomicílio. Consideradas como espécies independentes, a relação *L. neivai*/*L. intermedia* s.s. (contando apenas as fêmeas) corresponderia a aproximadamente oito para um.

A prevalência por ecótopo foi homogênea entre as fêmeas das duas linhagens, com ambas predominando em maior número na mata, em segundo lugar no domicílio e em terceiro no peridomicílio; o que denota uma característica em comum quanto à distribuição nos diferentes ambientes.

Assim como sucedeu-se com o Complexo *L. intermedia*, onde a diferenciação entre as duas linhagens é proposta essencialmente com base em caracteres morfológicos sutis, BALBINO *et al.* (2006) referiram-se à variação fenotípica em *L. longipalpis* (vetor de *L. infantum* na América Latina), que

inicialmente foi descrita baseada em características diferenciais no sexo masculino a partir de duas regiões geográficas no Brasil (MANGABEIRA, 1969). A suposição de que as variações morfológicas ocupariam nichos ecológicos distintos levou o autor a sugerir que elas poderiam representar variedades distintas ou espécies. Posteriormente, a ocorrência simpátrica dos dois fenótipos, bem como a identificação de uma forma fenotípica intermediária, resultou na redução gradual da importância taxonômica desta característica.

Apenas o uso de marcadores morfológicos para a distinção entre espécies crípticas ou variedades muito próximas, é razão da origem de dificuldades para um conhecimento mais amplo a respeito do inseto em questão. Deste modo, as técnicas de biologia molecular oferecem condições mais consistentes para a diferenciação destes grupos, onde os dados genéticos tornam-se uma ferramenta útil na pesquisa epidemiológica.

Vários autores utilizaram RAPD para determinar o nível de variabilidade genética em insetos, e em saúde pública, existe um interesse especial acerca dos vetores de patógenos, tanto para elucidar se há relação entre o genótipo do vetor com a sua competência vetorial como para aclarar as dúvidas correntes a respeito dos complexos de espécies, como é o caso de *L. intermedia*.

Para separar duas espécies morfológicamente indistinguíveis, WILKERSON *et al.* (1993), amplificaram o DNA de populações de *Anopheles gambiae* e *A. arabiensis* (vetores de *Plasmodium* na África) através de RAPD. Dos treze “primers” escolhidos para a análise, sete produziram bandas de diagnóstico. Apesar da extrema semelhança morfológica entre estas espécies, os resultados do RAPD sugeriram uma dissimilaridade genética, que pode ser explicado por troca de material genético entre elas e uma divergência relativamente recente, além de uma evolução acelerada do DNA e também pelo efeito do fundador (por se tratar de colônias de laboratório).

Analisando por meio de RAPD e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA) adultos da geração F1 de fêmeas de *A. cruzii* (um dos vetores de *Plasmodium* spp. no Brasil) coletadas nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, CALADO *et al.* (2006) encontraram um grande número de bandas e elevado polimorfismo, tanto dentro como entre as

diferentes populações. Pelos resultados do RAPD, os autores não sugerem a presença de mais de uma espécie no complexo *A. cruzii*, mas que esta é altamente polimórfica. Os autores ainda afirmam que as pequenas distâncias genéticas entre as populações podem estar relacionadas com a proximidade dos pontos de coleta, o que permite troca de material genético através da migração dos indivíduos.

De acordo com RIDLEY (2006), o fluxo gênico pode ser definido como a movimentação de “genes” para uma “população”, através de intercruzamento ou por migração e intercruzamento. Desta forma, o RAPD torna-se uma ferramenta útil para se verificar a existência ou não de migrações entre indivíduos de diferentes populações, sejam elas de espécies diferentes ou da mesma espécie, porém de regiões geográficas distintas.

Em estudo realizado por BALBINO *et al.* (2006), a análise do polimorfismo genético de sete populações de *L. longipalpis*, obtidas da região Nordeste, sugeriu um grau moderado de estruturação genética, com o encontro de 24 loci através do RAPD com três “primers”. Esta homogeneidade genética encontrada entre as populações de *L. longipalpis* é justificada pelos autores como resultado do isolamento geográfico e fluxo gênico restrito, sendo compatível com a hipótese da existência de uma única espécie deste flebotomíneo no Nordeste do Brasil.

DEZFOULI *et al.* (2002), utilizando como marcadores o ITS2 (região interespaçadora 2 do DNA ribossomal) e o RAPD para analisar insetos da espécie *A. fluviatilis* (vetor de *Plasmodium* no Irã) provenientes de oito localidades iranianas, sugerem que este táxon dispõe de apenas uma espécie, com uma baixa variação genética entre as populações.

Os resultados obtidos no presente estudo, pelas ampliações com o “primer” A10, denotaram a existência de fluxo gênico entre os insetos estudados, pois indivíduos não só de diferentes ecótopos como de municípios diferentes, foram agrupados em um mesmo subgrupo, com variados graus de similaridade. Tal é o caso das amostras ADM1 e CAD5, CAP1 e CAD10, CAP2 e ADM15 (todos pertencentes ao subgrupo de número “2”, na Figura 14).

A forte evidência de fluxo gênico é denotada não apenas pela análise do dendrograma originado pelo “primer” A10, como pela constatação de que

insetos de diferentes municípios apresentaram o mesmo genótipo (Tabela 6): CAM1, CAM3 e ADM2 (genótipo 9); e CAM5, ADM3 e ADM4 (genótipo 11).

A ocorrência de fluxo gênico pode ser explicada pela falta de barreiras físicas consideráveis entre as duas áreas de estudo, que distam em torno de 30km. Os municípios de Adrianópolis e Cerro Azul pertencem ao mesmo ecossistema, o Vale do Rio Ribeira, e são limítrofes. O não isolamento geográfico destas populações permite aos insetos realizar migrações, e desta maneira, permutar material genético com outros insetos de diferentes áreas.

O RAPD com o “primer” A10 também foi útil para agregar os flebotomíneos conforme sua espécie ou subgênero. O grupo contendo *L. intermedia* s.s., *L. whitmani*, *L. pessoai* e *L. fischeri* gerou um dendrograma (Figura 15) onde os agrupamentos foram formados segundo a espécie ou subgênero. Os agrupamentos formados agruparam os dois exemplares de *L. intermedia* s.s., os dois exemplares de *L. whitmani*, e por fim, o exemplar da espécie *L. pessoai* com o exemplar da espécie *L. fischeri*, ambos pertencentes ao mesmo subgênero (*Pintomyia*). Neste último caso, a distância genética entre os exemplares foi maior, que pode ser justificada pelo fato de não pertencerem à mesma espécie, ao contrário dos outros dois agrupamentos, onde as amostras agrupadas são da mesma espécie e portanto apresentando um coeficiente de similaridade maior.

O RAPD também pode ser uma ferramenta útil para se distinguir insetos em função do seu ecótopo/localidade, como demonstrou o “primer” A2.

Outros estudos obtiveram resultados satisfatórios na utilização do RAPD como marcador para distinguir populações de insetos vetores conforme a origem geográfica. Na análise realizada por MANGUIN *et al.* (1999), os fragmentos produzidos por RAPD demonstraram os agrupamentos formados entre populações de *A. darlingi* (vetor de *Plasmodium* spp. na América do Sul) segundo a origem geográfica. A similaridade genética encontrada entre estas populações é consistente com a existência de uma única espécie, sendo sugerida a ocorrência de fluxo gênico em toda a abrangência geográfica da espécie.

DVORAK *et al.* (2006), procurando aclarar a natureza taxonômica de *Phlebotomus sergenti* (vetor de *Leishmania tropica* no Velho Mundo), desenvolveram colônias com populações deste flebotomíneo oriundas da

Turquia e Israel, e com as proles obtidas realizaram caracterização genética através da análise da região ITS2 e RAPD. O último marcador apontou para a formação de subgrupos bem distintos correspondentes à origem de cada colônia, havendo, no entanto, um nível elevado de variabilidade dentro de cada subgrupo. Não houve padrão de agrupamento significativo em razão do sexo em nenhum dos dois grupos formados.

MENESES *et al.* (2005) compararam insetos machos de três populações de *L. intermedia* (*L. intermedia* s.s.) da mesma área endêmica de LTA no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, também coletados no domicílio, peridomicílio e mata. Com o uso de RAPD, exceto para um dos “primers”, todos foram polimórficos, com a distinção de dois subgrupos principais, um relacionado com o ambiente domiciliar e peridomiciliar e outro com o silvestre, sendo este último o mais polimórfico, apresentando o maior número de genótipos e baixo grau de similaridade entre eles. De acordo com os autores, em função do elevado nível de fluxo gênico entre os diferentes habitats, cinco indivíduos provenientes da mata foram agrupados com o subgrupo formado pelos insetos do domicílio e peridomicílio, e um indivíduo proveniente do domicílio foi agrupado com o subgrupo dos insetos da mata.

O dendrograma gerado pelo “primer” A2 revelou dois subgrupos principais, com um formado por insetos de Adrianópolis, e o segundo formado por insetos capturados em Cerro Azul. No agrupamento principal envolvendo os insetos de Adrianópolis (Figura 16, “1”), houve a formação de subgrupos estruturados conforme o ecótopo de origem dos insetos, porém, com a inserção de exemplares deslocados do seu ecótopo de origem, como ocorreu no agrupamento “2”, como o inseto CAM4 (oriundo da mata de Cerro Azul) agregado com outros três insetos do domicílio de Cerro Azul.

Estes arranjos de insetos oriundos de ecótopos diferentes do que é prevalente, no agrupamento no qual eles foram inclusos, também podem ser justificados pela existência de fluxo gênico e migração. Ambos os agrupamentos são formados por insetos do mesmo município.

PINEDO-CANCINO *et al.* (2006) utilizaram RAPD para verificar a variação genética a nível micro-geográfico em nove populações geograficamente separadas (20-60 km) de *A. darlingi* na cidade de Iquitos (Peru). A Média de Distância Genética obtida demonstrou a homogeneidade

genética entre estas populações e, portanto, a existência de elevado nível de fluxo gênico.

SOUZA *et al.* (2004), avaliando através de RAPD a variabilidade genética de quatro populações de *L. whitmani* provenientes de diferentes áreas de transmissão de LTA no Brasil, evidenciaram dois agrupamentos espaciais principais com um elevado nível de variabilidade intrapopulacional: Corte de Pedra (Bahia), Ilhéus (Bahia) e Serra de Baturité (Ceará) no primeiro grupo, e Martinho Campos (Minas Gerais) no segundo. Os deslocamentos observados sugerem a existência de fluxos genéticos entre as linhagens norte-sul/nordeste e Ilhéus-Serra de Baturité. A grande maioria dos indivíduos dessas populações foi agrupada de acordo com sua região de origem, no entanto, diferentemente do sexo feminino, 13% dos machos de Martinho Campos foram deslocados para a Serra de Baturité, em vez de Ilhéus. A não-uniformidade genética da linhagem de Martinho Campos é justificada pela existência de populações simpátricas nestas regiões, pois os indivíduos com perfis intermediários podem ser explicados pela ocorrência de fluxo gênico entre as populações estudadas.

ROCHA *et al.* (2007) utilizaram RAPD para analisar populações de *L. intermedia* de duas áreas endêmicas de LTA do Espírito Santo (municípios de Viana e Afonso Cláudio), Brasil, onde os padrões de transmissão de *Leishmania* são distintos. A análise por meio deste marcador permitiu aos autores verificar baixo nível de variabilidade dentro da população dos insetos coletados no domicílio, comparando com os coletados no peridomicílio. O grau de estruturação genética entre as populações destas duas áreas foi baixo, indicando que a separação geográfica destas populações foi um evento recente. É sugerido que as diferenças observadas entre estas populações de *L. intermedia* estão sendo influenciadas por várias barreiras naturais para o vôo.

No presente estudo, o peridomicílio foi o ecótopo que apresentou a maior diversidade genotípica, e a existência dessa diversidade pode ser explicada pelas condições geográficas apresentadas pelos locais de coleta, pois em sua grande parte constitui-se o peridomicílio em espaço livre para a realização de migrações, sendo localizado proximamente tanto do domicílio como da mata. Considerando a não existência de barreiras para o vôo, *L. intermedia* no Vale do Ribeira do Paraná pode deslocar-se e garantir o fluxo

gênico. Esta hipótese é corroborada pelo potencial de dispersão que estes insetos possuem. GALATI *et al.* (2009), analisando a dispersão e sobrevivência de flebotomíneos do Complexo *L. intermedia* em área endêmica de LTA no Vale do Ribeira de São Paulo (Iporanga), verificaram que a distância mediana de dispersão foi de 109 e 100 metros para *L. intermedia* s.s. e *L. neivai*, respectivamente. A distância máxima de dispersão de *L. intermedia* s.s. foi de 180 metros, enquanto que exemplares de *L. neivai* foram recapturados em uma pastagem a 250 metros e outro em um chiqueiro a 520 metros, mostrando uma tendência a se dispersar para as áreas mais abertas.

Para explicar a diversidade genética observada dentro e entre as populações de *L. intermedia* de Viana e Afonso Cláudio, ROCHA *et al.* (2007) mencionam o tempo de colonização humana das duas localidades (200 e 80 anos, respectivamente), e que pode refletir diferenças no comportamento destas populações. Os autores salientam que embora tenha havido uma tendência de indivíduos coletados em um mesmo ecótopo para agrupar em um mesmo grupo fenético, este fato não indica necessariamente a separação genética entre as populações. Este achado vai de encontro com os resultados do presente trabalho, onde o tempo de colonização humana no Vale do Ribeira do Paraná também é recente.

Ainda de acordo com ROCHA *et al.* (2007), o elevado nível de estruturação genética das populações de *L. intermedia* nos diferentes ecótopos de Viana pode refletir a independência entre o ciclo doméstico e o ciclo peridomiciliar na transmissão da LTA, e que a divergência genética de *L. intermedia* está ocorrendo em função das mudanças em seus habitats de floresta original com a capacidade desta espécie de adaptar-se a novos ambientes.

De fato, na região do Vale do Ribeira paranaense, existe uma sucessiva mudança da paisagem de floresta original, condição esta que favorece o aparecimento de *L. intermedia* nos ambientes peridomiciliares e domiciliares e sua adaptação nestes ambientes. A elevada diversidade genética aqui encontrada não pode sugerir uma independência entre os ciclos silvestre, peridomiciliar e domiciliar de transmissão de *Leishmania*, pois ambos os ecótopos são muito próximos uns dos outros.

Os perfis de amplificação pelos “primers” A3 e A9 não demonstraram polimorfismo, a exemplo dos iniciadores A10 e A2, e portanto, os insetos que tiveram seu DNA amplificado com estes “primers” não foram submetidos à análise fenética. Os “primers” A3 e A9, no entanto, geraram um fragmento característico, com peso molecular entre 400 e 500 pb.

DIAS *et al.* (1998) compararam quatro populações de *L. longipalpis* da América Latina, utilizando indivíduos criados em laboratório, provenientes de regiões geograficamente distintas, através de RAPD. Apenas um dos iniciadores testados foi capaz de distinguir uma das populações das outras três.

MUKHOPADHYAY *et al.* (2000) também implementaram a técnica de RAPD para encontrar perfis de DNA espécie-específicos para diferenciar duas espécies estreitamente relacionadas e morfologicamente semelhantes, *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi* (vetores de *Leishmania major* no Velho Mundo). Dos 22 “primers” testados, um deles gerou amplificações com perfis diferenciais entre as duas espécies, com uma banda característica de 700 pb presente em *P. papatasi*, e uma de 490 pb presente em *P. duboscqi*.

Os “primers” utilizados no presente trabalho têm como referência o estudo publicado por REVOLLO (1995), onde a diversidade genética do protozoário *Trypanosoma cruzi* é analisada, através de isoenzimas e RAPD. Nesta análise, houve uma concordância entre os resultados obtidos dos perfis isoenzimáticos com os do RAPD, sendo que este marcador apresentou um nível de resolução superior ao primeiro, dado o número de genótipos identificados (10 “primers” foram utilizados).

Assim, através do uso destes quatro iniciadores neste estudo, pôde-se ter uma noção do grau de estruturação genética de *L. intermedia* no Vale do Ribeira do Paraná. Apesar do “primer” A10 revelar a intensidade do fluxo gênico existente dentro da população nas duas áreas estudadas, o “primer” A2 foi útil ao agregar os insetos segundo sua origem bio-geográfica. Já as bandas características geradas pelos “primers” A3 e A9 sinalizam uma possibilidade de uso destes iniciadores como marcadores espécie-específicos ou ecótopo-específicos.

## 7 CONCLUSÕES

- 1 A fauna flebotomínica na área estudada é composta por pelo menos 04 espécies: *L. intermedia s.l.*, *L. pessoai*, *L. fischeri* e *L. migonei*; sendo *L. intermedia* a mais prevalente (93,28% dos flebotomíneos coletados);
- 2 A linhagem *L. intermedia s.s.* está presente no Vale do Ribeira paranaense, sendo encontrada nos municípios de Cerro Azul e Adrianópolis;
- 3 A fauna flebotomínica pertencente à espécie *L. intermedia s.l.* no Vale do Ribeira do Paraná apresenta uma grande variabilidade intra-específica;
- 4 O estudo por RAPD com o iniciador A2 agrupou *L. intermedia s.s.* com *L. intermedia s.l.*, fato que apóia a existência de uma espécie única em *L. intermedia*. Este “primer” mostrou ser o melhor marcador, pois mostrou tendência em agrupar os insetos segundo sua origem biogeográfica;
- 5 Nenhum exemplar de *L. intermedia* foi encontrado infectado, mas seu papel como vetor pode ser considerado, em função da sua grande capacidade de adaptação em ambientes modificados, da sua alta prevalência nos ecótopos estudados e da sua grande diversidade genotípica.

## 8 PERSPECTIVAS

Apesar da gama extensa de trabalhos científicos relacionados à fauna flebotomínica brasileira, as pesquisas norteadas à caracterização genética destes dípteros ainda é incipiente.

Pela importância na epidemiologia da Leishmaniose Visceral, *L. longipalpis* acumula uma quantidade de conhecimento que a coloca na vanguarda dos avanços nesta área.

Não menos importante, a Leishmaniose Tegumentar Americana tradicionalmente apresenta-se como um desafio frente às autoridades de saúde pública, dados as suas implicações patológicas e o caráter espontâneo com que a doença afeta as populações humanas.

O Vale do Ribeira, por ser uma das áreas brasileiras onde a LTA manifesta-se endemicamente, requer atenção constante e contínua para com o ciclo de transmissão de *Leishmania*. Neste sentido, mais estudos sobre a diversidade dos flebotomíneos na região acarretam em maiores contribuições à compreensão da natureza desta parasitose, e logo, em medidas de prevenção mais eficientes.

Por ser a espécie de flebotomíneo mais prevalente nesta região, e por ser considerado um dos vetores primários de *L. braziliensis* na América do Sul, *L. intermedia* torna-se objeto incontestado de novas demandas no estudo de sua biologia.

O presente trabalho supriu uma parte destas demandas, ao dar uma contribuição sobre a diversidade genética desta espécie. Outros trabalhos fazem-se necessários não só para novos conhecimentos a respeito da sua diversidade molecular, mas para maiores esclarecimentos sobre a sua participação no ciclo de transmissão de *Leishmania*.

Assim, propõem-se como perspectivas de estudo, mais coletas de insetos, na tentativa de se encontrar e isolar o protozoário, e ainda, analisar a diversidade da fauna flebotomínica na região e verificar o comportamento destes insetos frente a diferentes condições: estações, temperatura, ecótopos, preferências alimentares, fases lunares, e outros.

Outrossim, as pesquisas envolvendo técnicas de biologia molecular tornam-se imperativas, quando considera-se o potencial de sensibilidade

destas técnicas de acordo com os objetivos colocados. Para tanto, propõem-se o uso de novas técnicas moleculares para estudos sistemáticos e taxonômicos, e também para o encontro de um ou mais marcadores confiáveis para a diferenciação ou agrupamento das variedades e/ou linhagens existentes dentro de *L. intermedia*.

O uso de mais “primers” no RAPD, de enzimas de restrição e isoenzimas, bem como o sequenciamento das regiões espaçadoras do DNA ribossomal e de marcadores reconhecidos como úteis na diferenciação específica de outros grupos de insetos, como o gene “period”, são ferramentas valiosas para a compreensão de um dos principais vetores de *Leishmania* no Novo Mundo, da sua relação com o protozoário e com a transmissão do mesmo para os seres humanos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, R.E., WARD, R.D., FELICIANGELI, M.D. & MAINGON, R. 1993. The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. **Med. Vet. Entomol.** **7**(3): 203-207.
- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W. & TAYLOR, M. F. J. R. 2005 .The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** **52**(5): 399-451.
- ADLER, S. 1963. Differentiation of *Leishmania brasiliensis* from *L. mexicana* and *L. tropica*. **Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.** **23**: 139-152.
- ALENCAR, J.E. 1983. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará Méd** **5**: 86-102.
- ANDERSON, B.E. & NEUMAN, M.A., 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** **10**, 203–219.
- ANDRADE-FILHO, J.D., GALATI, E.A.B. & FALCÃO, A.L. 2003. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz** **98** (8): 1059-1065.
- ANDRADE-FILHO, J.D., GALATI, E.A.B. & FALCÃO, A.L. 2006. Polymorphism, inter-population and inter-specific variation in *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Rev. Bras. entomol.** **50** (3): 385-393
- ARAGÃO, H.B. 1922. Transmissão de leishmaniose tegumentar no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brás. Médico**, **36**: 129-130.
- ARANSAY, A.M., SCOULICA, E., TSELENTIS, Y. & READY, P.D., 2000. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. **Insect Mol. Biol.** **9**, 157–168.

- ARIAS, J.R. & FREITAS, R.A. 1982. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brasil.3: Phlebotominae sandfly stratification in "terra firme" forest. **Acta Amazônica 12**: 599-609.
- ARRIVILLAGA, J., MUTEBI, J.P., PIÑANGO, H., NORRIS, D., ALEXANDER, B., FELICIANGELI, M. D. & LANZARO, G. C. 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isoenzyme variation. **J. Med. Entomol.** 40: 615–627
- AVISE, J.C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution.** Chapman & Hall, Londres.
- AZEVEDO, A.C.R., MONTEIRO, F.A., CABELLO, P.H., SOUZA, N.A., ROSA-FREITAS, M.G., RANGEL, E.F. 2000. Studies on Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz 95** (3): 305-322.
- BADARÓ, R. & DUARTE, M.I. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Veronesi: Tratado de Infectologia.** São Paulo: Ed. Atheneu, 1997. p. 1234-1259.
- BALBINO, V.Q., COUTINHO-ABREU, I.V., SONODA, I.V., MELO, M.A., ANDRADE, P.A., CASTRO, J.A., REBÊLO, J.M., CARVALHO, S.M. & RAMALHO-ORTIGÃO, M. 2006. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Tropica 98**: 15–24.
- BAÑULS, A.L., GUERRINI, F., LE PONT, F., BARRERA, C., ESPINEL, I., GUDERIAN, R., ECHEVERRIA, R., TIBAYRENC, M. 1997. Evidence for hybridization by multilocus enzyme eletrophoresis and random amplified polimorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. **J. Euk. Microb.** 44: 408-411.
- BARRAUD, P.J. 1929. A simple method for carriage of living mosquitos over long distances in the tropics. **Indian Journal of Med. Res.** 17: 281-285.
- BARRETT, T. V., 1993. Cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil: Eco-epidemiology and questions of control. In: *Research and Control of Leishmaniosis in Brazil: Proceedings of National Workshop* (S. P. Brandão

- Filho, ed.), pp. 31-44, Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
- BARRETTO, M.P. *Observações sobre biologia em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Díptera:Psychodidae)*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1943, 162 p.
- BASANO, A. & CAMARGO, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** 7 (3): 328-337.
- BAUZER, L.G.S.R. 2002. *Análise da diferenciação genética entre populações de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva 1912) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) utilizando o gene period como marcador molecular*. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.
- BAUZER, L.G.S.R., GESTO, J.S.M., SOUZA, N.A., WARD, R.D., HAMILTON, J.G.C., KYRIACOU, C.P. & PEIXOTO, A.A. 2002. Molecular Divergence in the *period* Gene Between Two Putative Sympatric Species of the *Lutzomyia longipalpis* Complex. **Mol. Biol. Evol.** 19(9):1624–1627.
- BEATI, L., CACERES, A., LEE, J.A. & MUNSTERMANN, L.E. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. **International Journal for Parasitology** 34: 225–234
- BRANDÃO-FILHO, S.P., BRITO, M.E., CARVALHO, F.G., ISHIKAWA, E.A., CUPOLILLO, E., FLOETER-WINTER, L. & SHAW, J.J. 2003. Wild and synantropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 97: 291–296.
- BROWN, T. A . 1997. **Gene Cloning: an introduction**. London, Chapman & Hall, 3ª. Ed.
- BRUMPT, E. & PEDROSO, A. 1913. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo. **Ann. Paul. Med. Cir.:** 1 (4): 97-136.

- CALADO, D., NAVARRO-SILVA, M.A. & SALLUM, M.A. 2006. PCR-RAPD and PCR-RFLP polymorphisms detected in *Anopheles cruzii* (Diptera, Culicidae). **Rev. Bras. de Entomol.** **50**(3): 423-430.
- CAMARGO, J.B. 1998. **Geografia física, humana e econômica do Paraná.** Paranaíba, Clichetec, 2<sup>a</sup>. Ed.
- CASTRO, E.A. 2001. *Aspectos epidemiológicos e parasitológicos da leishmaniose tegumentar em duas regiões do Estado do Paraná e o papel do cão na manutenção do ciclo de Leishmania.* Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001, 188p.
- CASTRO, E.A., THOMAZ-SOCCOL, V., LUZ, E., MEMBRIVE, N., 2002. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **35** (5): 445-452.
- CASTRO, E.A., LUZ, E., TELLES, F.Q., PANDEY, A., BISETO, A., DINAISKI, M., SBALQUEIRO, I. THOMAZ-SOCCOL, V. 2005. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica** **93**: 141-149.
- CASTRO, E.A., THOMAZ-SOCCOL, V., AUGUR, C. & LUZ, E. 2007. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology** **117**: 13–21
- CHANCE, M.L, PETERS, W. & SHCHORY, L. 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I-Observations on DNA. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **68** (3): 307-316.
- CHANIOTIS, B. N. 1967. The biology of California *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. **J. Med. Entomol** **4**:221–233.
- CIGOLINI, A., MELLO, L. LOPES, N. 1998. **Paraná - quadro natural, transformações territoriais e economia.** Curitiba.
- COLLINS, F.H.; M.A. MENDEZ; M.O. RAMUSSEN; P.C. MEHAFFEY; N.J. BESANSKY & V. FINNERTY. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. **Am. J. Hyg.** **37**: 37-41.

- CONDINO, M.L.F., SAMPAIO, S.M.P., HENRIQUES, L.F., GALATI, E.A.B., WANDERLEY, D.M.V. & CORRÊA, F.M.A. 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**: 355-360.
- CONVIT, J., ALARCÓN, C.J., MEDINA, R. REYES, O. & KERDEL-VEGAS. 1959. Leishmaniasis tegumentaria difusa. Nueva entidad clinico-patologica y parasitaria. **Arch. Venez. Pat. Trop. Parasitol. Med.** **3** (1): 218-251.
- COUTINHO, J.O. 1940. Localização de formas em leptomonas, possivelmente de *Leishmania braziliensis*, na faringe do *Phlebotomus pessoai* naturalmente infestado. **An. Fac. Med. S. Paulo** **16** : 163-171.
- COUTINHO, J.O. & BARRETTO, M.P. 1941. Dados bionômicos sobre o “*Phlebotomus fischeri*” Pinto, 1926 (Diptera, Psychodidae). **Rev. Bras. Biol.** **1**: 423-429.
- CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G. & MOMEN, H. 1994. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50** (3): 296-311.
- DEPAQUIT, J., PERROTEY, S., LECOINTRE, G., TILLIER, A., TILLIER, S., FERTÉ, H., KALTENBACH, M. & LÉGER, N., 1998. Systématique moléculaire des Phlebotominae: étude pilote. **C. R. Acad. Sci. Paris** **321**: 849–855.
- DEPAQUIT, J., FERTÉ, H., LÉGER, N., KILLICK-KENDRICK, R., RIOUX, J.-A., KILLICK-KENDRICK, M., HANAFI, H.A., GOBERT, S., 2000. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 Rdna sequences. Hypothesis of dispersion and speciation. **Insect Mol. Biol.** **9**: 293–300.
- DEZFOULI, S.R., OSHAGHI, M.A., VATANDOOST, H., DJAVADIAN, E., TELMADAREI, Z. & ASSMAR, M. 2002. Use of Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) and ITS2 PCR assays for differentiation of populations and putative sibling species of *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in Iran. **Iranian J. Publ. Health** **3**: 133-137.
- DESJEUX, P. 1996. Leishmaniasis, public health aspects and control. **Clinics**

in **Dermatology** **14**, 417–423.

DIAS, E.S., FORTES-DIAS, C.L., STITELER, J.M., PERKINS, P.V. & LAWYER, P.G. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **40** (1): 49-53.

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

DOMINGOS, M.F., CARRERI-BRUNO, G.C., CIARAVOLO, C., GALATI, E.A., WANDERLEY, D.M. & CORRÊA, F.M. 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31** (5): 425-432.

DVORAK, V., AYTEKIN, A.M., ALTEN, B., SKARUPOVA, S., VOTYPKA, J. & VOLF, P. 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). **Journal of Vector Ecology** **31** (2): 229-238.

ESCOMEL, E. 1911. La espundia. **Bull. Soc. Pat. Exot** **4**: 489-492.

FALQUETO, A. & SESSA, P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Veronesi: Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1997. p. 1221-1233.

FELICIANGELI, M.D. 1987. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela, I. Description of the study area, catching methods and species composition. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **82** (1): 119-124.

FELICIANGELI, M.D., ARREDONDO, C., WARD, R., 1992. Phlebotomine sandflies in Venezuela: review of the verrucarum species group (in part) of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) with description of a new species from Lara. **J. Med. Entomol.** **29**, 729–744.

FERREIRA, A.L. SESSA, P.A. VAREJÃO, J.B.M. & 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. **Mem. Ins Oswaldo Cruz. 96**: 1061-1067.
- FONSECA A.P. & FONSECA, W.S. 1986. Leishmaniose tegumentar difusa. Relato de um caso. **Ann. Bras. Dermatol., 61** (3): 145-149.
- FORATTINI, O. P. 1954. Algumas observações sobre biologia de flebotomos (Diptera, Psychodidae), em região da bacia do rio Paraná (Brasil). **Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8**: 15-136.
- FORATTINI, O.P. 1960. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2** (4) : 195-203.
- FORATTINI, O.P. 1960. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera,Psychodidae). **Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 25**: 209-215.
- FORATTINI, O.P. 1973. **Entomologia Médica**. São Paulo, EDUSP, vol. 4, 658p.
- FORATTINI, O.P & M.R. SANTOS. 1952. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912, por formas de leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. **Arc. Hyg. São Paulo 17**: 171-174.
- FORATTINI, O.P. & OLIVEIRA, O. 1957. Um foco de leishmaniose tegumentar na zona sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Fac. Hig.e Saúde Pública 11**: 23-34.
- FORATTINI, O.P, RABELLO, E.X., PATTOLI, D.B.G. & O.A. FERREIRA. 1972. Nota sobre um foco de leishmaniose tegumentar na região nodereste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ. 6**: 103-105.
- FORATTINI, O. P., RABELLO, E.X., SERRA, O.P., COTRIM, M.D., GALATI, E.A.B. & BARATA, J.M.S. 1976. Observações sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ. 10**: 31-43.
- GALATI, E. A. B, 1991. **Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas**. Tese apresentada ao departamento de epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.

- GALATI, E.A., FONSECA, M.B., MARASSÁ, A.M., BUENO, E.F. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **104** (8): 1148-1158.
- GOMES, A. C. 1994. Sand fly vectorial ecology in the state of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; **89** (3):457-60
- GOMES, A.C. & E.A. GALATI. 1989. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente de floresta primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Públ.** **23**: 136-142.
- GOMES, A.C, RABELLO, E.X., SANTOS, J.F.L. & E.A. GALATI. 1986. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observation on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the São paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Públ.** **20**: 280-287.
- GOMES, A.C., COUTINHO, S.G. PAIM, G.V., OLIVEIRA, S.M.O., GALATI, E.A.B., NUNES, M.P., CAPINZAIKI, A.N., YAMAMOTO, Y. I. & ROTTER, P. 1990. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.** **32** (2): 105-115
- GOMES, A.C. 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **An. bras. Derm.**, **67**: 55-60
- GOMES, A.C. & NEVES, V.L.F.C. 1998. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **(6)**:553-558
- GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **36** (1): 71-80.
- GRIMALDI G. Jr., TESH, R.B. & McMAHON-PRATT, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg.** **41**(6):687-725.

- GRIMALDI, G. & TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol Rev.** **6**: 230-250.
- GUERIN, P.J., OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P., WASUNNA, M.K. & BRYCESON, A.D. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis.** **2**(8): 494-501.
- HERMETO, M.V., VIEIRA-DIAS, D., GENARO, O., ROTONDO-SILVA, A., COSTA, C.A., TOLEDO, P.C.P., MICHALICK, M.S.M., WILLIAMS, P., MAYRINK, W., 1994. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio-Doce Valley, Minas-Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **89**, 519–521.
- HERTIG, M., FAIRCHILD, J.B., & JOHNSON, C.M. 1957. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Ann. Rep. Gorgas Memorial Laboratory,** **1956**: 9-11.
- HERWALDT, B. L. 1999. Leishmaniasis. **Lancet** **354**: 1191-1199.
- IAPAR. **Instituto Agrônômico do Paraná. Cartas climáticas do Estado do Paraná.** 1994. Londrina: IAPAR.
- IPARDES. Disponível em <<http://www.ipardes.gov.br>>. Acesso em: 02/06/2010.
- ISHIKAWA, E.A.Y., READY, P.D., DE SOUZA, A.A., DAY, J.C., RANGEL, E.F., DAVIES, C.R. & SHAW, J.J., 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazônia and Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **94**: 339–345.
- JONES, T.C., JOHNSON, W.D., BARRETO, A.C., LAGO, E., BADARO, R., CERF, B., 1987. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.** **156**, 73–83.
- KAMHAWI, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Trends in Parasitology,** **22 (9)**: 439-445.
- KILLICK-KENDRIK, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology** **17**: 279-289.

- LAINSON, R. 1983. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.** **77**: 569-596.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **Brit. Med. Bull.** **28**: 44-48.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W.H. & EVANS, D.A. **Biology of the Kinetoplastida**. Vol.2. London: Academic Press, 1979. p.1-116.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, vol. 1. Academic Press, London, pp. 1–120.
- LANZARO, G.C. & WARBURG, A. 1995. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. **Parasitol. Today** **11**: 151–154
- LEMOES, J.C. & LIMA, S.C. 2005. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos em área de transmissão no Município de Uberlândia, MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **38** (1): 22-26
- LEVINE, N. D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, **27(1)**: 37-58.
- LINDENBERG, A. 1909. A úlcera de Bauru e seu micróbio. **Rev. Med. Univ. São Paulo** **12**: 116-120.
- LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology (Review). **Bull. Entomol. Res.** **88**: 577–600.
- LUTZ, A. & NEIVA, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **4**: 82-95.
- LUZ, E., MEMBRIVE, N., CASTRO, E.A., DEREURE, J., PRATLONG, F., DEDET, J. A., PANDEY, A. & THOMAZ-SOCCOL, V., 2000. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **An. Trop. Med. & Paras.** **94**:623-631.

- MAIA-ELKHOURY, A.N., ALVES, W.A., SOUSA-GOMES, M.L., SENA, J.M. & LUNA, E.A. 1998. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública** **24**(12): 2941-2947.
- MANGABEIRA, O. 1969. Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. **Rev. Bras. Mal. Doen. Trop.** **21**: 3–26.
- MANGUIN, S., WILKERSON, R.C., CONN, J.E., RUBIO-PALIS, Y., DANOFF-BURG, J.A. & ROBERTS, D.R. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, Random Amplified Polymorphic DNA, Internal Transcribed Spacer 2, and morphologic markers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **60**(3): 364–376.
- MARCONDES, C.B., 1996. A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **91**: 457-462.
- MARCONDES, C.B., 1997. Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Tese de Doutorado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. xxiv+260p. 1997.
- MARCONDES, C.B., DAY, J.C. & READY, A.L. 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *L. neivai* and *L. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania brasiliensis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **91**: 725-726.
- MARCONDES, C.B., LOZOVEI, A.L. & VILELA, J.H. 1998. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31**: 51-58.
- MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; FALQUETO, A.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; AGUIAR, G. M. & SOUZA, N. A. 1999. Influence of altitude, latitude and season of collection (Bergmann's Rule) on the dimension of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neivai, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **94**: 693–700.

- MARSDEN, P.D. 1986. Mucosal leishmaniasis (Espundia/Escomel, 1911). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **80**: 859-876.
- MARSDEN, P.D. 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **27** (2): 93-101.
- MARTINS A.V., WILLIAMS P. & FALCÃO A.L. **American Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**, Rio de Janeiro: Acad. Bras. Ciências, 1978. 195pp.
- MARTINS, L.M., REBÊLO, J. M., SANTOS, M.C., COSTA, J.M., SILVA, A.R. & FERREIRA, L.A. 2004. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Cadernos de Saúde Pública.** **20**, (3): 735-743.
- MASSAFERA, R., SILVA, A.M., CARVALHO, A.P., SANTOS, D.R., GALATI, E.A.B. & TEODORO, U. 2005. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no Estado do Paraná. **Rev. Saúde Públ.** **39** (4): 571-7
- MAZZONI, C.J., SOUZA, N. A., ANDRADE-COELHO, C., KYRIACOU, C.P. & PEIXOTO, A.A. 2006. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the *period* gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. **BMC Evolutionary Biology** **6** (85): 1-11.
- MENESES, C.R., CUPOLILLO, E., MONTEIRO, F. & RANGEL, E.F. 2005. Micro-geographical variation among male populations of the sandfly, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, from an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology** **19**: 38–47.
- MILES, M. A . & WARD, R.D. 1978. Preliminary isoenzyme studies on phlebotominae sand flies (Diptera:Psychodidae) . **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** **72**: 398-399.
- MIRANDA, R.N. & SCHWEIDSON, J. 1955. A Leishmaniose Tegumentar no Paraná. **Rev. Méd. do Paraná** **24**: 5-6.
- MOLYNEUX, D.H. & KILLICK-KENDRICK. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, vol. 1. London: Academic Press, 1987

- MS. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília: Editora MS, 2007, 180p.
- MUKHOPADHYAY, J., KASHINATH, G. & BRAIG, H.R. 2000. Identification of cutaneous Leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. **Acta Tropica** **76**: 277–283.
- NERY-GUIMARÃES, F. 1955. Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **53**:1-11.
- NIEVES, E. & PIMENTA, P. F. 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **67**(6): 640-647.
- OLIVEIRA, S.G., BOTTECCHIA, M., BAUZER, L.G.S.R., SOUZA, N.A., WARD, R.D., KYRIACOU, C.P. & PEIXOTO, A.A. 2001. Courtship Song Genes and Speciation in Sand Flies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **96** (3): 403-405.
- OLIVEIRA-NETO, M.P., PIRMEZ, C., RANGEL, E., SCHUBACH, A., GRIMALDI, J.R.G., 1988. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Rio de Janeiro: clinical and epidemiological. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **83**, 427–435.
- 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. 2001. New molecular markers for phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology** **31**: 635-639.
- PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. 1941. Infecção natural e experimental dos flebótomos por *Leishmania braziliensis*, no Estado de São Paulo. **Hospital, Rio de Janeiro** **20** : 25-35.
- PESSON, B., VALLON, M., FLOER, M.T. & KRISTENSEN, A.R. 1991. Etude isoenzymatique de populations méditerranéennes de Phlébotomes du sous-genre *Larroussius*. In: Maroli, M. (Ed.), Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies. **Parassitologia** **33** (1): 471–476.
- PETERSON, A.T. & SHAW, J. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted

- geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology** **33** : 919–931.
- PIFANO, C., ALVAREZ, A. & ORTIZ, I. 1962. Investigaciones sobre la leishmaniasis tegumentaria americana en los Valles del Tuy, Venezuela. **Arch. Venez. Med. Trop.** **4** : 149-155.
- PIMENTA, P.F., SECUNDINO, N. F. & BLANCO, E.E. Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. In: RANGEL, E.F. & LAINSON, R. (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 275-289.
- PINEDO-CANCINO, V., SHEEN, P., TARAZONA-SANTOS, E., OSWALD, W.E., JERI, C., VITTOR, A.Y., PATZ, J. & GILMAN, R.H. 2006. Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon region of Iquitos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **75**(2): 238–245.
- PITA-PEREIRA, D., CARDOSO, M.A., ALVES, C.R., BRAZIL, R.P. & BRITTO, C. 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.** **107** (1): 66-69.
- PITA-PEREIRA, D., SOUZA, G.D., ZWETSCH, A., ALVES, C.R., BRITTO, C. & RANGEL, E.F. 2009. First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **80** (4): 593-595.
- PROGRAMA VALE DO RIBEIRA. Disponível em : <<http://www.valedoribeira.ufpr.br/vale.htm>>. Acesso em: 02/06/2010.
- RANGEL, E.F., SOUZA, N.A., WERMELINGER, E.D., AZEVEDO, A.C., BARBOSA, A.F. & ANDRADE, C.A. 1986. Flebotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **81** (3): 347-349.
- RANGEL, E.F. & LAINSON, R. Transmissores da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E.F. & LAINSON, R. (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 291-309.
- READY, P.D., LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1984. Habitat and seasonality of *Psychodopygus wellcomei* help incriminate it as a vector of *Leishmania*

- braziliensis* in Amazônia and Northeast Brazil. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.** **78**: 543-544.
- READY, P.D., LAINSON, R., SHAW, J.J. & WARD, R.D. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera, Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in northeastern Amazonian Brazil. **Bull Ent Res** **76**: 21-40.
- READY, P.D., SMITH, D.F. & KILLICK-KENDRICK, R. 1988. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. **Med Vet Entomol.** **(2)**:109-16.
- READY, P.D.; LAINSON, R., SHAW, J.J. & SOUZA, A.A. 1991. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* (Diptera:Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **86** (1): 41-49.
- READY, P., DAY, J.C., SOUZA, N.A., RANGEL, E.F., & DAVIES, C.R. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. **Bull. Entomol. Res.** **87**: 187-195.
- REVOLLO, M.S. 1995. *Impact de l'évolution clonale de Trypanosoma cruzi, agent de la maladie de Chagas, sur certaines propriétés biologiques médicalement importantes du parasite.* These de doctorat, Université Montpellier, Montpellier, France, 1995, 225p.
- RIDLEY, M. **Evolução.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- RIOUX, J.A., LANOTTE, G., SERRES, E., PRATLONG, F., BASTIEN, P. & PERIERES, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp.** **65** (3):111-25.
- ROCHA, L.S., FALQUETO, A., SANTOS, C.B., GRIMALDI, G. Jr. & CUPOLILLO. 2007. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. **Am J Trop Med Hyg.** **76**(3): 559-65.

- ROHLF, F.J. Numerical Taxonomy System f Multivariate Statistical Programs. User's guides. New York; State University, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.
- SANTOS, D.R., SANTOS, A.R., POIANI, L.P., OLIVEIRA, O., SILVA, A.M. & GALATI, E.A. 2009. Ocorrência de *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera:Psychodidae) e Fauna Associada, no Paraná. **Neotropical Entomology** **38**(2): 298-301.
- SHAW, J., ROSA, A. T., SOUZA, A. & CRUZ, A. C. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E.F. & LAINSON, R. (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003. p. 337-351.
- SILVA, O. S. 2000. *Studies on Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Parque Estadual do Turvo, RGS, Brazil and their role in Leishmania transmission*. Tese de Doutorado, Eberhard - Karls - Universität Tübingen, Tübingen, 2000.
- SILVA, A.C. & GOMES, A.C. 2001. Estudo da Competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. **Rev Soc Bras Med Trop** **34**: 187-191.
- SILVA, A.M., CAMARGO, N.J., SANTOS, D.R.F., MASSAFERA, R., FERREIRA, A.C., POSTAI, C., CRISTÓVÃO, E.C., KONOLSAISEN, J.F., BISETO, A., PERINAZO, R., TEODORO, U. & GALATI, E.A.B. 2008. Diversidade, Distribuição e Abundância de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology** **37**(2):209-225.
- SOARES, R.P. & TURCO, S.J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **75**(3): 1-30.
- SOARES, R.P., MARGONARI, C., SECUNDINO, N.C., MACÊDO, M.E., COSTA, S.M., RANGEL, E.F., PIMENTA, P.F. & TURCO, S.J. 2010. Differential Midgut Attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the Sand Flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** **2010**: 1-7.

- SOUZA, C.M., FORTES-DIAS, C.L., LINARDI, P.M. & E.S. DIAS. 2004. Phenetic studies on randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction-variability of four geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **37**(2): 148-153.
- SUDIA, W.D. & CHAMBERLAIN, R.W. 1962. Battery operated light trap, na improved model. **Mosquito News** **22**: 126-129.
- TEODORO, U. & J.B. KÜHL. 1997. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no sul do Brasil. **Rev. Saúde Públ.** **31** (5): 512-6.
- TEODORO, U., KÜHL, J.B, THOMAZ-SOCCOL, V., BARBOSA, O.C., FERREIRA, M.E.M.C., LOZOVEI, A.L. & T.G.V. SILVEIRA. 1997. Influence of peri-domiciliar a environment conditions in the dispersion and proliferation of phlebotominae sandflies in Paraná State, southern Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.** **40**: 747-51.
- TEODORO, U., THOMAZ-SOCCOL, V.; KUHL, J.B. *et al.* 2004. Reorganization and cleanness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. **Braz. arch. biol. technol.** **47** (2): 205-212.
- TEODORO, U., SANTOS, D., SANTOS, A., OLIVEIRA, O., POIANI, L., SILVA, A., NEITZKE, H., MONTEIRO, W., LONARDONI, M. & SILVEIRA, T. 2006. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. **Rev. Saúde Públ.** **40** (2): 327-30.
- TESTA, J.M., MONTOYA-LERMA, J., CADENA, H., OVIEDO, M. & READY, P.D. 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. **Acta Trop.** **84**, 205–218.
- THOMAZ-SOCCOL, V. 1993. *Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les Leishmania de l’Ancien Monde.* These de doctorat, Faculté de Médecine, Montpellier, France, 1993, 190p.

- THOMAZ-SOCCOL, V., CASTRO, E.A., DEREURE, J., PRATLONG, F. MEMBRIVE, N. & DEDET, J.P. 2003. *Leishmania* species in two regions of Paraná, Brazil: Biochemical characterization by isoenzyme electrophoresis. *In: New Horizons in Biotechnology*, organizado por S. Roussos; C.R. Soccol; A. Pandey; C.
- THOMAZ-SOCCOL, V., CASTRO, E.A., CHNELL E SCHÜHLI, G., CARVALHO, Y., MARQUES, E., PEREIRA, E.F., ALCANTARA, F.S., MACHADO, A.M., KOWALTHUK, W., MEMBRIVE, N. & LUZ, E. 2009. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. **Acta Tropica** **111**(3) : 308-15.
- TOLEZANO, J.E. 1994. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz.** **89**, 427–434.
- TOWNSEND, C.H.T. 1913. A *Phlebotomus* : the practically certain carrier of verruga. **Science** **38**, 194–195.
- URIBE SOTO, S.I., LEHMANN, T., ROWTON, E.D., VÉLEZ, I.D.B. & PORTER, C.H. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. **Mol. Phylogenet. Evol.** **18**: 84–93.
- VIANNA, G. 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). **Brazil Médico**, 25: 411.
- WARD, R.D., MORTON, I.E., LANCASTER, V., SMITH, P. & SWIFT, A. 1989. Bioassays as an indicator of pheromone communication in *Lutzomyia longipalpis*. NATO ASI series on Leishmaniasis, Zakynthos, Greece **163**: 239–247.
- WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 22/06/2010.
- WILKERSON, R.C., PARSONS, T.J., ALBRIGHTT, D.G., KLEIN, T.A. & BRAUN, M.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). **Insect Molecular Biology** **1**(4): 205-211.

- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nuc. Acids. Res.** **18**: 6531-6535.
- YIN, H. MUTEBI, J.P., MARRIOTT, S. & LANZARO, G.C. 1999. Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Med Vet Entomol** **13**: 72-77.
- YOUNG, D.G. & M. DUNCAN, 1994. Guide to the identification and Geographical distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Am. Entom. Inst.** **54**: 881p.