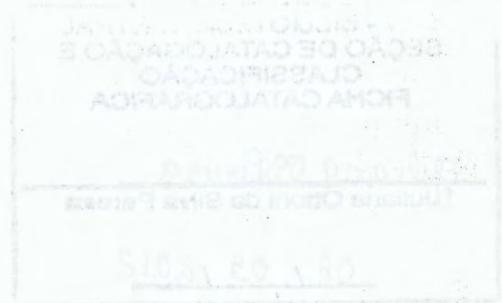


ANAYANSI VALDERRAMA CUMBRERA

**ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE FLEBOTOMÍNEOS TRANSMISSORES DE  
*LEISHMANIA* NO PANAMÁ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012



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

T

V144e  
2012

Valderrama Cumbreira, Anayansi, 1969-  
Estudo das populações de flebotomíneos transmissores de  
*Leishmania* no Panamá / Anayansi Valderrama Cumbreira.  
- Viçosa, MG, 2012.  
viii, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mara Garcia Tavares.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Lutzomya* - Genética. 2. Leishmaniose. 3. Genética de  
populações. 4. Animais - Populações. 5. Filogenia.  
6. Evolução (Biologia). 7. Genética. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

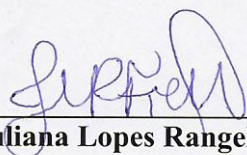
CDD 22. ed. 595.772

ANAYANSI VALDERRAMA CUMBRERA

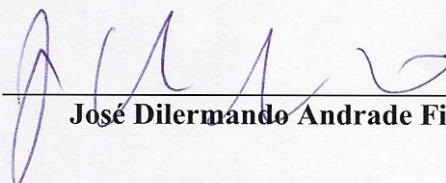
**ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE FLEBOTOMÍNEOS TRANSMISSORES DE  
*LEISHMANIA* NO PANAMÁ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

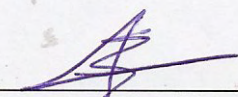
APROVADA: 15 de Fevereiro de 2012.



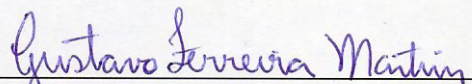
**Juliana Lopes Rangel Fietto**



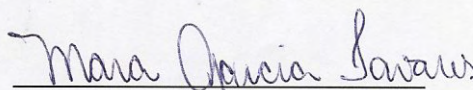
**José Dilermando Andrade Filho**



**Jorge A. Dergam dos Santos**



**Gustavo Ferreira Martins**



**Mara Garcia Tavares  
(Orientadora)**

Dedicado para minha mãe Maria Eneida  
Cumbrera (q.p.d) por seu grande amor.  
Aos meus familiares, de modo muito  
especial pra meu irmão Mario.

## AGRADECIMENTOS

- À Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT) pela concessão da bolsa de estudos e fornecer financiamento para desenvolvimento da pesquisa de teses;
- À Dra Mara Garcia Tavares, pela orientação, dedicação, confiança e colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Dr. José Dilermando Andrade Filho, pela ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- À Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) pelo apoio logístico e materiais de coletas dos espécimes;
- À Smithsonian Tropical Research Institute (STRI) pelo apoio logístico do projeto, especificamente para as coletas na Coiba e Bocas del Toro;
- À AES Panamá e Minera Panamá S. A. (MPSA) pelo apoio logístico para as coletas no Changuinola e Coclesito;
- A Yajaíra Perez e Solangel Chaves que realizaram as coletas dos flebotomíneos, durante época de chuva no Panamá;
- A meu pai Laurencio Cornejo Valderrama e familiares pelo incondicional apoio e por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida;
- Aos meus amigos do STRI, de modo especial ao Dra. Nélide Gómez, Lic. Rainaldo Urriola, Licda Marcela Paz, Mgt. Jorge Ceballos, Mgt. Mirna Samaniego, Dr. Joseph S Wright, Dra. Anette Aiello, Dr. David Roubik pelo incondicional apoio e sempre acreditar;
- Aos meus amigos do ICGES, de modo especial ao Dr. Nestor Sosa, Dr. José Calzada, Licda Berta Abrego, Licda. Edilma Cedeño, Mgt. Roberto Miranda, pelo incondicional apoio e sempre manter a comunicação e minhas coisas organizadas;
- A todo o pessoal do Laboratório de Biología Molecular pela ajuda durante a parte laboratorial deste trabalho e pelas piadas que fizeram mais fácil ficar longe de casa;
- A Maykon Cristiano Passo pelo apoio incondicional, amizade e dicas no desenvolvimento da parte molecular deste trabalho;
- Aos todos meus amigos brasileiros, colombianos e de todas as nacionalidades pela amizade sincera;

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
I. Introdução geral .....	1
II. Referências Bibliográficas.....	5
Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae) vectors of cutaneous leishmaniasis in panama ... .....	8
Report of <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lut & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama .....	16
Intercâmbio genético e reconstrução histórica das populações de <i>Lutzomyia gomezi</i> (Diptera: Phlebotominae) no istmo de Panamá.....	19
Comparação da diversidade genética e estruturação geográfica das populações silvestres e peridomiciliares de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) .....	45
III. Conclusões gerais .....	62

## RESUMO

VALDERRAMA CUMBRERA, Anayansi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Estudo das populações de flebotomíneos transmissores de *Leishmania* no Panamá.** Orientadora: Mara Garcia Tavares. Coorientadores: José Eduardo Serrão e José Lino Neto.

Os flebotomíneos são dípteros nematóceros que pertencem à família Psychodidae (subfamília Phlebotominae) e têm importância epidemiológica por serem vetores de doenças. São transmissores dos arbovírus da família Reoviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae e da bactéria Bartonellaceae. Entretanto, atualmente, o principal problema epidemiológico está relacionado à transmissão das espécies do gênero *Leishmania*. Com o objetivo de obter informações atualizadas sobre a ecologia e genética dos flebotomíneos vetores de leishmanioses cutânea no Panamá foram realizadas coletas em 43 locais. Esses locais foram escolhidos porque ocorreram relatos de casos em humanos, nos mesmos, durante o período de 2006 – 2009. As coletas dos indivíduos foram realizadas com armadilhas luminosas colocadas no peridomicílio de locais classificados segundo as características paisagísticas em fragmentados (pouco impacto antropogênico), rurais (maior impacto antropogênico) e também em florestas (sem impacto antropogênico). Com os dados obtidos analisou-se a composição, distribuição geográfica, diversidade e abundância de espécies, bem como a associação dos flebotomíneos com os diferentes tipos de paisagem estudados. Os resultados obtidos revelaram que as espécies vetores *Lutzomyia panamensis*, *Lu. gomezi* e *Lu. trapidoi* foram as de maior abundância e distribuição. Outras espécies vetoras como *Lu. ylephiletor*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. carrerai*, *Lu. ovallesi* e *Lu. olmeca bicolor* apresentaram pouca distribuição geográfica. A diversidade de espécies vetores foi maior no ambiente rural, mas, *Lu. gomezi* e *Lu. trapidoi* foram associadas a ambientes fragmentados. Ressalta-se também a coleta de *Lu. longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral, no peridomicílio de uma região endêmica em leishmanioses cutânea. Analisou-se também a variabilidade genética de 501 nt das regiões do citocromo B/início da NADH1 (mitocondrial) e 622 nt do fator de alongação nuclear  $\alpha$ -1 de populações de *Lu. gomezi* e *Lu. longipalpis*. *Lu. gomezi* foi escolhida para as análises moleculares por estar presente em 38 dos 43 locais amostrados e *Lu. longipalpis*, pela pouca informação existente sobre a espécie, no Panamá. Os resultados das análises populacionais com *Lu. gomezi* mostraram uma alta diversidade de haplótipos, pouca estruturação genética, sugerindo a capacidade de migração e

adaptabilidade das populações de *Lu. gomezi* às mudanças ambientais. Os resultados com *Lu. longipalpis*, por sua vez, revelaram diferenças genéticas entre as populações, sugerindo que a dispersão e/ou a vicariância contribuíram para a diferenciação das populações desta espécie no Panamá. Os conhecimentos e as informações geradas neste estudo poderão contribuir para a prevenção da doença em zonas de risco de contágio e para a elaboração de programas de vigilância e controle entomológico.

## ABSTRACT

VALDERRAMA CUMBRERA, Anayansi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Study of sand fly population transmitter of *Leishmania* in Panamá.** Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-Advisers: José Eduardo Serrão and José Lino Neto.

The sand flies are insects of the order Diptera (nematocera), family Psychodidae, subfamily Phlebotominae that are recognized as important disease vectors. They are known to be vectors of arbovirus belonging to the family Reoviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae as well as vectors of bacteria of family Bartonellaceae. However, sand flies gained more epidemiological relevance as vectors of the causative agents of leishmaniasis. In order to obtain updated information on the ecology and population genetics of sand fly vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama, we collected sand flies samples from 43 sites in this country. These sites were chosen because of to the high incidence of human cases of cutaneous Leishmaniasis during the period 2006 to 2009. The collections of individuals were carried out using light traps placed around houses in locations classified as fragmented landscapes (low anthropogenic impact), rural (high anthropogenic impact) forests (no impact anthropogenic). Gathered data was assessed in order to analyze the composition, geographic distribution, diversity and abundance of sand fly species and also to associate each species to a particular type of studied landscape. *Lutzomyia panamensis*, *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* showed a wider distribution and the highest abundances. Other vector species such as *Lu. ylephiletor*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. carrerai*, *Lu. ovallesi*, *Lu. olmeca bicolor* showed low geographic distribution. The diversity of vector species was higher in rural environments and only *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* were associated to fragmented environment. Surprisingly, we found *Lu. longipalpis* vector of leishmaniasis visceral in peridomestic habitats of an endemic region of cutaneous leishmaniasis. The genetic variability of *Lu. gomezi* and *Lu. longipalpis* populations were assessed by cytochrome B/NADH1 and elongation factor  $\alpha$ -1 gene sequence. *Lu. gomezi* showed a high diversity of haplotype, low genetic differentiation and geographical structuring, suggesting the migration capability and adaptability of this specie to environmental changes. On the other hand, *Lu. longipalpis* populations were genetically different and presented geographical structuration suggesting that dispersion and/or vicariance might have contributed to the differentiation of its populations in Panama. The knowledge and information generated in this study may contribute to the prevention and control of leishmaniasis disease in areas at risk of infection as well as the development of entomological and surveillance programs that support this initiative.

## I. INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose é uma doença emergente ou reemergente e negligenciada, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um importante problema de saúde pública mundial (Ashford 2000). Essa doença produz altas taxas de mortalidade e estima-se que há um incremento de 1600.000 casos e 500.000 mortes a cada ano (WHO 2010). A enfermidade ocorre em 88 países considerados endêmicos, nas regiões tropical e subtropical, sendo que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorre em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, 90% da leishmaniose mucocutânea ocorre na Bolívia, Brasil e Peru e 90% de leishmaniose cutânea no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO 2010).

Essa doença é crônica, sendo causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e apresenta três formas clínicas: a leishmaniose cutânea e mucocutânea, que afeta a pele e tecidos mucosos e a leishmaniose visceral, mais grave, que afeta órgãos como fígado, baço e intestinos (Lara 2002).

No Panamá, três mil novos casos de leishmaniose são diagnosticados por ano; sendo 90% deles em áreas endêmicas. A doença tem mais registros nas províncias de Bocas del Toro, Chiriqui, Veraguas, Coclé e Panamá (MINSA 2005). A possível causa do incremento no número de casos é a alteração da dinâmica das populações de flebotomíneos silvestres, consequência da fragmentação florestal. Entretanto, outros fatores também permitem a ocorrência de casos de leishmaniose, como por exemplo, a penetração no interior das florestas para atividades como a caça, o turismo ecológico e a urbanização de áreas perto da mata, que são construídas sem medidas de precaução ou planejamentos de prevenção, como fumigar periodicamente para evitar o contacto dos vetores com os humanos (Ashford 2000).

A leishmaniose pode ser considerada uma doença primariamente zoonótica, pois ocorre na natureza entre populações de animais silvestres, sendo os mamíferos das florestas os reservatórios primários de *Leishmania*. As espécies de *Leishmania* reportadas para Panamá são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (Leishmania) mexicana* são os responsáveis pela leishmaniose tegumentar no Panamá. Também outras espécies como *L. (V.) colombiensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) aristidesi* e *L. (L.) hertigi* já foram isoladas de mamíferos (Herrer et al. 1971, Christensen et al. 1972, Miranda et al. 2009). O principal mamífero reservatório de *Leishmania (Vianna) braziliensis* é *Choloepus hoffmanni* (preguiça de Hoffmann), sendo que *Bradypus variegatus* (preguiça comum), *Saguinus geoffroyi* (sagui

panamenho), *Nasua nasua* (quati), *Potos flavus* (jupará), *Bassaricyon gabbi* (olingo), *Proechimys semispinosus* (roedor silvestre), *Hoplomys gymnurus* (roedor silvestre) desempenham papel secundário no Panamá (Miranda et al. 2009).

A transmissão da leishmaniose aos humanos ocorre com a picada dos flebotomíneos, durante a ingestão de sangue (Christensen 1972, Herrer & Christensen 1973, Christenses et al. 1984). No Panamá, esses flebotomíneos são conhecidos, vulgarmente, como chitra, já-te-vi ou mosca-de-bejuco (Herrer et al. 1971, Christensen et al. 1984).

Das 800 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, 74 espécies já foram encontradas no Panamá, em zonas de florestas (Christensen 1972, Herrer & Christensen 1973, Feliciangeli 1988). Dessas, *Lu. ylephiletor* (Fairchild & Hertig 1952), *Lu. sanguinaria* (Fairchild & Hertig 1957), *Lu. panamensis* (Shannon 1926), *Lu. trapidoi* (Fairchild & Hertig 1952) e *Lu. gomezi* (Nitzulescu 1931) são responsáveis pela transmissão de espécies causadoras da leishmaniose tegumentar (Christensen et al. 1983).

A diversidade vegetal, animal e os fatores microclimáticos que caracterizam as florestas tropicais fornecem recursos alimentícios, abrigos e condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos flebotomíneos, influenciando a abundância e diversidade dessas comunidades (Silva et al. 2007). Certas espécies dependem muito das características específicas do tipo de floresta, o que determina sua especificidade a um único tipo de bosque; outras espécies, por sua vez, podem estar relacionadas a mais de um tipo de vegetação (Feitosa & Castellon 2006, Silva et al. 2007, Valderrama et al. 2008). Assim, estudos populacionais sobre esses vetores tornam-se importantes para verificar o efeito do desmatamento florestal sobre populações específicas. Jiménez et al. (2000) e Travi et al. (2002), por exemplo, verificaram que o desmatamento produz aumento na abundância e diminuição na diversidade dos flebotomíneos, fazendo com que as espécies emigrem para áreas próximas aos domicílios ou para dentro dos mesmos. Isto aumenta o risco da transmissão de leishmaniose no domicílio e peridomicílio (Silva et al. 2007).

Com a fragmentação florestal e urbanização, novos habitat tornam-se disponíveis para a colonização. Isto, aliado as condições do microclima (temperatura e umidade) podem favorecer o crescimento populacional de vetores (Koenkaadt et al. 2003, Minakawa et al. 2001, Alto & Juliano 2001). *Lu. longipalpis* por exemplo, tem conseguido adaptar-se as mudanças ambientais, devido à influências antropogênicas e, estabelecer-se nos peridomicílios e áreas urbanizadas. Esta espécie também se adapta a

ecótopos que apresentam condições climáticas distintas de uma região para outra, com facilidade (Ready et al. 1998).

Essas adaptações às diferentes ecótopos se refletem nas variações morfológicas que acabam por diferenciar as populações. Nesse sentido, variações morfológicas dessa espécie foram observadas por Mangabeira (1969) ao coletar machos de populações de *Lu. longipalpis* em diferentes estados brasileiros. Por exemplo, machos coletados nos Estado do Pará apresentavam uma única mancha clara no quarto tergito abdominal, enquanto os do Ceará apresentavam duas manchas. Essas variações morfológicas foram consideradas por Ward et al. (1983) para explicar as implicações epidemiológicas e a capacidade de transmissão da leishmaniose dessas duas formas. De acordo com estes autores, a forma com duas manchas abdominais tem maior relevância epidemiológica, por estar presente em regiões que apresentam altas taxas de casos de leishmaniose visceral.

Análises do conteúdo da saliva de *Lu. longipalpis* provenientes da Costa Rica, Colômbia e Brasil também demonstraram que as diferenças na composição química do peptídeo maxadilina tinham influência na proliferação da *Leishmania* e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença (Lanzaro et al. 1999, Warburd et al. 1994).

Estudos moleculares, utilizando os genes mitocondriais ND4 e COI também evidenciaram diferenças genéticas entre as populações de *Lu. longipalpis* distribuídas pela América Central e do Sul, sugerindo a existência de quatro complexos de espécies crípticas (Arrivillaga et al. 2002). Análises de feromônios e marcadores microssatélites, evidenciaram a existências de duas espécies crípticas nas populações de Sobral (Maingon et al. 2003). Por outro lado, a análise das sequências do gene mitocondrial citocromo b de seis populações de *L. longipalpis* peridomiciliares, coletadas nas regiões de Natal (RN), Jacobina (BA) e Sobral (CE) não foi suficiente para indicar se *L. longipalpis* é ou não um complexo de espécies (Hodgkinson et al. 2003). Entretanto, um estudo mais recente com marcadores microssatélites sugere que *L. longipalpis* está passando por um processo de especiação causado por barreiras naturais como o rio São Francisco (Coutinho-Abreu et al. 2008).

Verifica-se assim que ainda não existe um consenso sobre a situação de *L. longipalpis* no Brasil e que a mesma situação pode estar ocorrendo com outras populações e/ou espécies, o que justifica a realização de estudos populacionais e moleculares com os diversos vetores de leishmaniose, bem como a análise das implicações epidemiológicas dessas populações.

No Panamá, a falta de documentação atualizada sobre a ocorrência e contaminação de flebotomíneos e de estudos moleculares com as diferentes espécies desses insetos não permitem fazer inferências sobre a epidemiologia das leishmanioses. Atualmente, porém, existe um interesse internacional em aumentar o conhecimento sobre a variabilidade genética destes vetores, não só por sua epidemiologia, mas também pelas questões acima levantadas, acerca da especiação do grupo.

Considerando esse panorama e que a partir de 2000 registrou-se um incremento dos casos de leishmaniose no Panamá (Miranda et al. 2009), torna-se evidente a necessidade de se avaliar os fatores que afetam a epidemiologia dessa doença. Para isto, é importante fazer coletas de indivíduos das espécies vetores em áreas silvestres, urbanizadas e de transição, de modo a documentar o panorama atualizado desse sistema epidemiológico.

O desenvolvimento do presente trabalho visou atualizar as informações disponíveis sobre os vetores dos parasitos das leishmanioses no Panamá, uma vez as únicas informações disponíveis são aquelas presentes em artigos clássicos (Fairchild et al. 1951, Tesh et al. 1971, Chaniotis et al. 1971) e estudos e coletas sistematizadas do vetor não têm sido realizados desde os anos 80.

Os conhecimentos e as informações geradas neste estudo poderão contribuir para a prevenção da doença em zonas de risco de contágio e para a elaboração de programas de vigilância sanitária, controle entomológico e prevenção. Além disso, ao longo do desenvolvimento do trabalho pretendeu-se estimular pesquisas de colaboração internacional que possam auxiliar no controle mais eficiente das leishmanioses.

## II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alto BW, Juliano SA 2001. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for range expansion. *J Med Entomol* 38: 646-656.

Arrivillaga J, Rangel, YN, Oviedo M, Feliciangeli MD 2000. Correlated Morphologic and genetic diversity among *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Psychodidae) collection in Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 16: 171-174.

Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.

Chaniotis BN, Neely JM, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM 1971. Natural population Dynamic of phlebotominae sandflies in Panamá. *J Med Entomol* 8: 339-352.

Christensen H 1972. Check of the Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosquito News* 32: 89.

Christensen HA, Herrer A, Telford SR 1972. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. II. Entomological investigations. *Ann Trop Med Parasitol* 66: 55-66.

Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A, Johnson C, Young D, de Vásquez A 1983. The ecology of cutaneous, leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 20: 463-484.

Christensen H, Johnson C, de Vasquez AM 1984. Leishmaniasis cutánea en Panamá: un breve resumen. *Revista Médica de Panamá*. 9: 182-1987.

Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ, Ortigão MR 2008. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasit Vectors* 1: 16.

Dujardin JP, Beard B, Rykman R 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae. *Infect Genet Evol* 7:161-167.

Fairchild B, Hertig M 1951. Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae) VIII. Two new species of *Warileya*. *Ann Entomol Soc Am* 44: 422-429.

Feitosa MAC, Castellón EG 2006. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjunto habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazonica*. 36: 539-548.

Feliciangeli MD 1988. La fauna flebotomina (Diptera: Psychodidae) en Venezuela. I. Taxonomia y distribución geográfica. *Bol Dir Malaria Sanam Ambient* 28: 99-113.

Herrer A, Telford S, Christensen H 1971. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panamá I: Investigation of the infection among forest mammals. *Ann Trop Med Parasitol* 65: 349-358.

- Herrer A, Christensen HA 1973. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 25: 54-58.
- Hodgkinson VH, Birungi J, Quintana M, Deitze R, Munstermann LE 2003. Mitochondrial Cytochrome B variation in population of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 386-392.
- Jimenez AE, Rojas JC, Vargas F, Herrero MV 2000. Temporal and spatial variation of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. *J Med Entomol* 37: 216-221.
- Koenraadt CJM, Githeko AK, Takken W 2004. The effects of rainfall and evapotranspiration on the temporal dynamics of *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in a Kenyan village. *Acta Tropica* 90: 141-153.
- Lanzaro GC, Lopes AHCS, Ribeiro JMC, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M, Titus RG 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 8: 267-275.
- Lara T 2002. Parasitología Médica. México. Méndez Edits. 147-164 pp.
- Maingon RDC, Ward RD, Hamilton JGC, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, Watts PC 2003. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. *Mol Ecol* 12:1879-1894.
- Mangabeira O 1969. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malariol Doenc Trop* 21: 3-25.
- Minakawa N, Githure JI, Beier JC, Yan G 2001. Anopheline mosquito Survival strategies during the dry period in western Kenya. *J Med Entomol* 38:388-392
- MINSA-Ministerio de Salud de Panamá 2005. Situación Nacional de Salud, Dirección Nacional de Salud. Panamá. MINSA. 57 pp.
- Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaría G, Mendoza Y, Calzada J 2009. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 81: 565-571.
- Silva DF, Freitas RA, Franco AMR 2007. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotrop Entomol* 36: 138-144.
- Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM 1971. Natural host preferences of Panamanian phlebotominae sandflies as determined by precipitin test. *Am J Trop Med Hyg* 20: 150-156
- Travi BL, Alder GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J 2002. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forest in Northern Colombia. *J Med Entomol* 39: 451-456.

Valderrama A, Herrera M, Salazar A 2008. Relación entre la composición de especies del género de *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. Acta Zool Mex (n.s.) 24: 67-78.

Warburg A, Saraiva e, Lanzaro GC, Titus R, Neva F 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and propensity to enhance leishmaniasis. Phil Trans Roy Soc Lond 345: 223-230.

Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas, and its significance to kala-azar distribution in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 78: 269-280.

World Health Organization 2010. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva. WHO Press. 172 pp.

# Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama

Anayansi Valderrama<sup>1,3/+</sup>, Mara Garcia Tavares<sup>1</sup>, José Dilermando Andrade Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs s/n, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos/Coleção de Flebotomíneos, Instituto René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil <sup>3</sup>Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panama, Panama

*In Panama, species of the genus Lutzomyia are vectors of American cutaneous leishmaniasis (ACL). There is no recent ecological information that may be used to develop tools for the control of this disease. Thus, the goal of this study was to determine the composition, distribution and diversity of Lutzomyia species that serve as vectors of ACL. Sandfly sampling was conducted in forests, fragmented forests and rural environments, in locations with records of ACL. Lutzomyia gomezi, Lutzomyia panamensis and Lutzomyia trapidoi were the most widely distributed and prevalent species. Analysis of each sampling point showed that the species abundance and diversity were greatest at points located in the fragmented forest landscape. However, when the samples were grouped according to the landscape characteristics of the locations, there was a greater diversity of species in the rural environment locations. The Kruskal Wallis analysis of species abundance found that Lu. gomezi and Lu. trapidoi were associated with fragmented environments, while Lu. panamensis, Lutzomyia olmeca bicolor and Lutzomyia ylephiletor were associated with forested environments. Therefore, we suggest that human activity influences the distribution, composition and diversity of the vector species responsible for leishmaniasis in Panama.*

Key words: phlebotomines - leishmaniasis - deforestation - ecology - species distribution

Leishmaniasis in Panama was first recorded in 1910. The staff of the Gorgas Memorial Laboratory has researched the ecology and epidemiology of leishmaniasis since that time. Cutaneous leishmaniasis is the most common form of leishmaniasis reported in the Republic of Panama; its clinical manifestations range from minor lesions to severe skin ulcers (Christensen et al. 1972, 1983, 1984). In humans, the disease is mainly caused by *Leishmania panamensis*, with a distribution extending from Belize-Argentina (Young & Duncan 1994, Miranda et al. 2009). However, other species such as *Leishmania colombiensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* have been reported; *Leishmania aristidesi* and *Leishmania hertigi* have both been isolated from mammals (Herrer 1971, Herrer et al. 1971, Christensen et al. 1972). Another strain, *Leishmania naiffi*, has recently been found in populations of *Lutzomyia gomezi* and *Lutzomyia trapidoi*, but it has not been found in human infections and its reservoirs remain unidentified (Azpurua et al. 2010).

Leishmaniasis is a primarily zoonotic disease. The sloth *Choloepus hoffmanni* is the primary reservoir of the parasite, but other wild mammals, such as *Brady-*

*pus variegatus*, *Saguinus geoffroyi*, *Nasua nasua*, *Potos flavus*, *Bassaricyon gabbi*, *Proechimys semispinosus*, *Hoplomys gymnurus* and *Coendou rothschildi*, have also been identified as reservoirs and their role as secondary hosts has been established (Christensen et al. 1984, Méndez 1999).

Phlebotomine sandflies are the vectors of leishmaniasis and are present in almost every country in tropical and subtropical regions. Central and South America have the greatest concentration of these vectors (Young & Arias 1992, Seccombe et al. 1993, Young & Duncan 1994). About 74 species of sandflies have been reported in Panama (Christensen 1972, Herrer & Christensen 1976), including *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia sanguinaria*, *Lutzomyia panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi* and *Lutzomyia olmeca bicolor*. These species were identified as the transmission vectors of the American cutaneous leishmaniasis (ACL) agent in Panama in the 1950s when *L. braziliensis sensu lato* was isolated from the vectors' digestive tracts (Herrer et al. 1971, Tesh et al. 1971, Herrer & Christensen 1973).

The distribution of phlebotomine sandflies in Panama correlates with the occurrence of ACL in the endemic regions of the provinces of Bocas de Toro, Veraguas, Coclé, Colón, Panama East, Panama West (MINSa 2005), especially in forest areas. Phlebotomine sandflies develop in humid locations, such as nests, rock crevices, animal burrows and tree bark (Christensen et al. 1983). However, with the depletion of forest and the disappearance of their natural habitat, some species seem to have adapted to degraded habitats, contributing to the spread of ACL (Jiménez et al. 2000, Travi et al. 2002).

Financial support: SENACYT COL09-008

+ Corresponding author: anayvald@yahoo.com

Received 3 July 2011

Accepted 17 October 2011

Few recent studies have appeared on the diversity, geographical distribution and abundance of the different species of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis agents in Panama. Thus, the aims of the present study were to determine the composition, geographical distribution and diversity of ACL vectors in the endemic regions of Panama. Additionally, this study sought to verify the association between the characteristics of the areas studied and the communities of phlebotomine sandflies inhabiting them.

#### MATERIALS AND METHODS

**Study area** - Sandflies were captured in Panama between the coordinates 7°11'-9°39'N and 77°10'-83°03'W. The most prevalent climatic regime in Panama is tropical humid, with the summer season (January-March) presenting an average temperature of 30°C and relative humidity of 75%. In other months (April-December), the average temperature is 27°C and the relative humidity averages 90%.

There are three different regions in Panama: the Atlantic region, where it rains all year long and there is no clearly defined dry season, the Pacific region, characterised by moderate to heavy rainfall and a well defined dry season, and the central region, that occupies most of the continental part of the country and is subjected to moderate to heavy rains and strong winds due to the thermal contrast between the other two regions.

The vegetation in Panama varies according to the climate zones and consists mainly of tropical humid forest or savannahs resulting from agricultural activity (ANAM 2000). The data on temperature, precipitation and humidity from 2007-2010 were obtained from the weather stations of the Empresa de Transmisión Eléctrica Panameña, located at different points in the country.

This study was conducted at 43 locations throughout eight regions or provinces of Panama (Fig. 1). The landscapes of the locations were heterogeneous with a variety of diverse macro habitats created by human activity. Each site was classified according to its landscape characteristics as one of the following: (i) forest environment,

an extension of land with abundant primary or secondary vegetation (flora, fauna and climatic conditions typical of tropical rainforest), (ii) fragmented forest environment, areas degraded by human activity (timber extraction, cattle farming, agriculture etc.), presenting small patches of secondary vegetation close to the degraded areas, or (iii) rural environment, a province or settlement without any great concentration of people or commercial activity, limited urban growth and area used for agriculture. The traps were distributed at specific collection points in each landscape. In the fragmentary forest and rural landscapes, the traps were placed in houses that lacked window covering were in close proximity to domestic animals and ornamental vegetation. For each forest locality, the traps were placed near rock crevices and tree bark.

Sandflies were collected during six months in 2010, January-April (dry season) and May-June (early rainy season) at 43 locations where human cases of ACL had been recorded from 2006-2009, according to the Epidemiology Department of the Ministerio de Salud de Panama.

Adult sandflies were collected using CDC light traps (Sudia & Chamberlain 1962) and octanol solution (used to attract haematophagous insects) exposed at a height of 1.5 m. At least nine light traps were installed in each locality at approximately 50-m intervals. The collection period was 12 h (06:00 pm-06:00 am) for two consecutive days. The specimens were sacrificed with chloroform and stored in 95% ethanol at -20°C.

**Identification of the collected specimens** - Sandflies were classified according to the methods of Young and Duncan (1994). The nomenclature of the subgenus *Psychodopygus* described by Carvalho et al. (2006) was used in this study.

**Analysis** - The total abundance ( $P_i$ ) ( $= n_i/N$ ) and diversity ( $H'$ ) ( $= -\sum p_i \ln p_i$ ) of sandfly species at each site was calculated in accordance with the methods described by Magurran (1988). To test the differences in sandfly species abundance at each type of landscape, the Kruskal Wallis test was used ( $p \leq 0.05$ ) in conjunction with the multiple comparison test ( $\alpha = 0.05$ ). Explora-

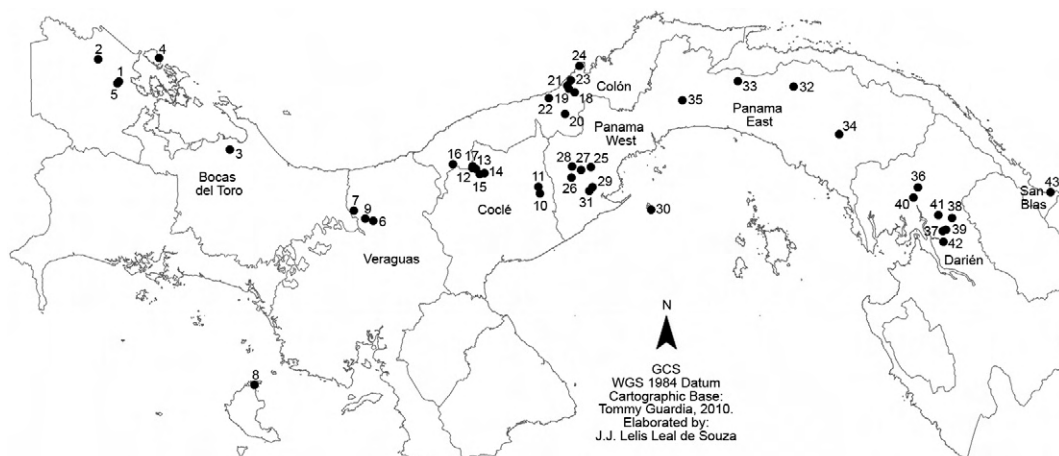


Fig. 1: geographical distribution of locations (see Table I) sampled of phlebotomine sandflies, vectors of American cutaneous leishmaniasis in Panama.

tory data (simple correspondence analysis) was tested to evaluate the association of the species with the characteristic landscape. In this analysis, only anthropophilic sandfly species were considered as ACL vectors in Panama (Herrer et al. 1971, Tesh et al. 1971, Herrero & Christensen 1973). Furthermore, other index of diversity ( $H'$ ) and dominance ( $D$ ) ( $= \sum p_i^2$ ) were conducted and Sørensen's similarity index ( $I_s$ ) ( $= 2c/a+b$ ) (Magurran 1988) was calculated to define the differences between the three landscapes.

## RESULTS

A total of 1,923 sandflies of the *Lutzomyia* genus were captured. Of these, 66.2% were anthropophilic species and vectors of *Leishmania* species in Panamá: *Lu. panamensis* 24.2%, *Lu. gomezi* 18.6%, *Lu. trapidoi* 15.6%, *Lutzomyia ovallesi* 3%, *Lu. sanguinaria* 1.5%, *Lu. olmeca bicolor* 1.2%, *Lu. ylephiletor* 0.9% and *Lutzomyia carrerai* 0.6%. The other 33.8% of sandflies captured were zoophilic species: *Lutzomyia triramula* 3.2%, *Lutzomyia dysponeta* 10.5%, *Lutzomyia camposi* 6.8%, *Lutzomyia vesicifera* 2.7%, *Lutzomyia sordellii* 0.5%, *Lutzomyia vesperillionis* 0.2%, *Lutzomyia carpenteri* 1.3%, *Lutzomyia serrana* 0.6%, *Lutzomyia gorbitzi* 0.3%, *Lutzomyia aclydifera* 4.2%, *Lutzomyia trinidadensis* 2%, *Lutzomyia cruciata* 0.5%, *Lutzomyia odax* 0.5% and *Lutzomyia barretoii* 0.6%, all of which are not responsible for transmitting the disease to humans as they are part of the wildlife cycle of leishmaniasis. *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis, also was collected in two localities, Limón and in Boná Island.

A detailed analysis of the anthropophilic species per location is shown in Table I. *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis* and *Lu. trapidoi* were wide-spread and present in 35, 27 and 26 out of the 43 locations sampled, respectively, and were the most predominant species at 15, 13 and seven of the locations, respectively. In contrast, *Lu. sanguinaria*, *Lu. olmeca bicolor* and *Lu. ylephiletor* were scarce and found at a small subset of locations. *Lu. ovallesi* is the most common vector of *L. braziliensis* in Venezuela and Guatemala, and although it contributed only a small percentage to the total number of sandflies captured, it was the predominant species identified at two locations in the Darién and in Ollas Arriba (provinces of Panama). *Lu. carrerai* was collected only in Charagre, in Bocas del Toro; information for this species not is shown in Table I because it was isolated in low numbers and at few locations. Nine specimens of *Lu. aclydifera* and six of *Lu. dysponeta* were captured in the Parque Altos de Campana.

The male to female ratio of captured sandflies was highest in Puerto Obaldía, El Llanillo and Unión Piña. In the other locations, more females than males were collected (Table I). Cutevilla, Vaquilla, Chirigui Arriba, Donoso, Piña and Ollas Arriba had high numbers of females (> 50) and only one male was isolated in Arimay.

Cutevilla, Chirigui Arriba, Vaquilla and Piña yielded the highest relative abundance of anthropophilic sandflies (0.11, 0.09, 0.06 and 0.06, respectively). The abundance of anthropophilic sandflies at the other locations varied from 0.004-0.052. Parque Altos de Campana was the only locality where no vector species was collected. In

35% of the sites sampled, the Shannon-Weiner  $H'$  varied from 1.03-1.49 and, in 42% of the sites, this index varied from 0.30-0.96 (Table I).

The number of cases of leishmaniasis registered in 2009 in the regions sampled is shown in Table I. Bocas del Toro, Colón and Coclé experienced the highest rates of leishmaniasis incidence, while the San Blas regions had the lowest incidence of leishmaniasis. Temperature, precipitation and humidity data are shown in Table I.

The abundance of *Lu. panamensis*, *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* varied significantly between the three types of environments ( $p < 0.05$ ). This difference, however, was not verified for *Lu. ylephiletor*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. ovallesi*, *Lu. carrerai* and *Lu. longipalpis* (Table II).

The analysis of simple correspondence between the species and the type of environment showed a strong association of *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* with fragmented environments. *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. panamensis* and *Lu. ylephiletor* were most strongly associated with forest environments and *Lu. sanguinaria*, *Lu. ovallesi*, *Lu. carrerai* and *Lu. longipalpis* did not show any association with any type of environment ( $\chi^2$ : 177,761;  $df = 16$ ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 2).

When the species diversity at each type of landscape was examined, the Shannon-Weiner index showed that the rural environments contained a higher diversity ( $H' = 1.51$ ) than the areas with fragmented vegetation ( $H' = 1.47$ ) and the forested areas ( $H' = 1.29$ ). The Simpson index, in turn, showed that forest environments ( $D = 0.35$ ) frequently had one dominant species, contrary to our observations in the fragmented ( $D = 0.27$ ) and rural environments ( $D = 0.25$ ). When the zoophilic species were included in the analysis, diversity was higher in the forest environments ( $H' = 2.41$ ) than fragmented vegetation ( $H' = 2.01$ ) and rural environments ( $H' = 1.99$ ). We also observed that the Simpson index showed higher dominance in fragmented environments ( $D = 0.20$ ), in rural environments ( $D = 0.18$ ) and in forest environments ( $D = 0.12$ ), contrary to the results with only anthropophilic vector species.

The similarity in sandfly species was 68.4% between the forest and rural environments; 55.7% between the rural and fragmented environments and 43.9% between the fragmented and forest environments. When zoophilic species are included, the similarity between rural and fragmented environments reached 57.1%.

## DISCUSSION

There are 7,476,836 ha of land in Panama. Of these, 43.36% are still covered by forest, but 33,531.61 ha are destroyed every year by human activity (ANAM 2009). This loss in vegetation results in the migration and adaptation of some vector species to degraded environments, increasing their spatial distribution (Service 1991, Walsh et al. 1993, Grillet 2000, Aguiar & Medeiros 2003).

The data obtained in this study shows the impact of human activity and deforestation on *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis* and *Lu. trapidoi*, abundant species with wide distributions in Panama. Earlier studies on sandflies reported the presence of these species in areas with leishmaniasis outbreaks, but showed that their geographical

TABLE I  
Abundance absolute and relative, Shannon diversity index (H'), sex ratio of sandfly species transmitter of leishmaniasis in the locations sampled in Panama

Regions	Locations	Landscape	Cases										H'	Weather			
			<i>Lutzomyia panamensis</i> (n)	<i>Lutzomyia gomezi</i> (n)	<i>Lutzomyia trapidoi</i> (n)	<i>Lutzomyia ylephiletor</i> (n)	<i>Lutzomyia sanguinaria</i> (n)	<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i> (n)	<i>Lutzomyia ovallesi</i> (n)	♂/♀	Pi	H'					
Bocas del Toro	1: Nance Valle Risco	Fr	437	36	2	3	-	1	-	-	-	11	31	0.4	0.03	0.55	Ta = 28
	2: Charagre	Fr		2	-	14	1	4	-	-	-	9	24	0.4	0.03	1.26	Pa = 3,000
	3: Bisira	R		5	5	-	-	-	-	-	-	2	8	0.3	0.01	0.69	Ha = 87
	4: Isla Colón	R		11	-	-	-	-	-	-	-	1	10	0.1	0.01	0	
Veraguas	5: Parque Nacional Palo Seco	Fo		-	-	1	-	-	-	-	0	1	0.0	0.001	0		
	6: Altos de Piedra	Fr	73	-	7	1	-	-	-	-	1	7	0.1	0.01	0.38	Ta = 25	
	7: Llanillo	Fr		4	-	6	-	-	3	-	-	7	6	1.2	0.01	1.06	Pa = 2,550
Coclé	8: Parque Nacional Coiba	Fo		-	7	-	-	-	1	-	-	1	7	0.1	0.01	0.38	Ha = 83
	9: Parque Nacional Santa Fé	Fo		-	-	1	-	-	-	-	0	1	0.0	0.001	0		
Panama West	10: Chirigui Arriba	R	296	80	8	21	-	3	-	-	-	54	58	0.9	0.09	0.84	Ta = 26
	11: Vaquilla	Fr		19	40	17	3	1	-	-	-	12	68	0.2	0.06	1.2	Pa = 2,117
	12: Coclesito-community	R		-	6	-	-	-	-	-	-	4	2	2.0	0.01	0	Ha = 88
	13: Coclesito-forest	Fo		6	1	2	2	-	-	-	-	5	6	0.8	0.01	1.17	
	14: Cutevilla	Fr		70	28	44	-	-	-	-	-	39	103	0.4	0.11	1.03	
	15: Molejón	Fr		14	9	7	-	-	-	-	-	7	23	0.3	0.02	1.06	
	16: Donoso	Fr		36	-	29	-	-	-	-	-	8	57	0.1	0.05	0.69	
	17: Villa del Carmen	R		8	3	-	-	-	-	-	-	3	8	0.4	0.01	0.59	
	18: Providencia	R	376	4	11	1	-	-	-	-	-	2	14	0.1	0.01	0.78	Ta = 30
	19: Achioté	R		1	10	-	-	-	-	-	-	1	10	0.1	0.01	0.3	Pa = 2,550
	Panama West	20: Cuipo	R		1	9	-	-	-	-	-	-	4	6	0.7	0.01	0.33
21: Piña		Fr		38	26	13	1	-	-	-	-	16	62	0.3	0.06	1.07	
22: Quebrada Leona		Fr		34	7	6	-	3	-	-	-	12	38	0.3	0.04	0.96	
23: Unión Piña		Fr		8	8	24	-	-	-	-	-	24	16	1.5	0.03	0.95	
24: Parque Nacional San Lorenzo		Fo		42	9	4	-	1	-	2	-	15	43	0.3	0.05	0.89	
25: Ollas Arriba		R	197	4	12	13	3	1	-	-	30	8	55	0.1	0.05	1.38	Ta = 27
26: Cacao		Fr		16	6	20	2	-	-	8	-	7	45	0.2	0.04	1.39	Pa = 1,704
Panama West	27: Valdeza	R		1	9	3	1	-	-	8	-	4	17	0.2	0.02	1.29	Ha = 60
	28: Vista Alegre	Fr		6	11	13	-	2	-	1	-	4	29	0.1	0.03	1.32	
	29: Limón	Fr		9	6	3	2	-	-	-	-	6	14	0.4	0.02	1.49	
	30: Boná	Fo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31: Parque Altos de Campana	Fo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		



Regions	Locations	Landscape	Cases										Weather				
			<i>Lutzomyia panamensis</i> (n)	<i>Lutzomyia gomezi</i> (n)	<i>Lutzomyia trapidoi</i> (n)	<i>Lutzomyia ylephiletor</i> (n)	<i>Lutzomyia sanguinaria</i> (n)	<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i> (n)	<i>Lutzomyia ovallesi</i> (n)	♂/♀ sex ratio	Pi	H'					
Panama East	32: Buenos Aires-Chepo	Fr	24	2	9	3	-	1	-	-	-	2	13	0.2	0.01	1.08	Tm = 27
	33: Gato Real	Fr	5	8	44	1	8	-	-	-	-	16	48	0.3	0.05	1.04	Pa = 1,704
	34: Torti	Fr	3	43	2	-	-	-	-	-	-	7	41	0.2	0.04	0.49	Ha = 87
	35: Cerro Azul	Fo	-	1	5	2	-	-	1	-	-	4	5	0.8	0.01	1.15	
	36: Arimay	R	81	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0	-	0.001	0	Tm = 27
Darién	37: Bijagual	Fr	-	-	8	-	-	1	-	-	-	4	10	0.4	0.01	0.88	Pa = 1,704
	38: Buenos Aires	R	-	-	9	-	-	-	-	-	18	6	21	0.3	0.02	0.64	Ha = 86
	39: Parque Serranía Filo del Tallo	Fo	-	-	6	-	-	-	-	-	-	4	2	2.0	0.01	0	
	40: La Cantera	R	-	-	13	-	-	-	-	-	-	3	10	0.3	0.01	0	
	41: Nicanor	Fr	-	-	4	-	-	-	-	-	4	2	8	0.3	0.01	0.69	
	42: Rio Iglesia	R	-	-	8	-	-	2	-	-	-	1	10	0.1	0.01	0.76	
	43: Puerto Obaldía	Fr	2	-	8	-	-	-	-	-	-	6	2	3.0	0.01	0	Tm = 28 Pa = 2,650 Ha = 83

Fo: forest; Fr: fragmented vegetation; Ha: average annual relative humidity; Pa: annual precipitation; Pi: abundance relative; R: rural; Ta: average annual temperature; ♂: male; ♀: female; ♂/♀: sex ratio.

distributions were restricted to high-humidity forest regions (Chaniotis et al. 1971a, Rutledge & Ellenwood 1975, Christensen et al. 1983). However, locations with recent outbreaks have been impacted by deforestation and there has also been an increase in the incidence of leishmaniasis in communities near the locations of the outbreaks.

The increase in leishmaniasis cases is due to a combination of multiple factors, involving changes in climate, human behaviours, vectors and reservoirs. The changing pattern of dispersal and the spatial distribution of sandflies to new locations are critical factors that may implicate an increased risk of human-vector contact. There are few similar studies that estimate the expansion of the vector species, but there are records from studies at the Gorgas Memorial Institute that were performed in the 1960-1980s that help us understand how the species distribution has changed. More current information could be used to alert health officials to what areas may be at risk for leishmaniasis and could help them evaluate what kind of intervention may be useful in those areas.

We observed that some species, such as *Lu. sanguinaria*, *Lu. ovallesi*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. carrerai* and *Lu. longipalpis*, exhibited a discontinuous distribution, i.e., they were identified in localities far from each other. It is probable, however, that these species are also present in the intermediate regions between the points where they were collected. Therefore, deforestation could also be contributing to the expansion of the geographic distribution of these species. A more intensive sampling and comparative data in the surrounding regions could be used to test this hypothesis.

Climatic variations, high humidity and the prolonged rainy season in Panama have fundamental roles in maintaining the diversity of habitats available to sandflies (Chaniotis et al. 1971a, Christensen et al. 1983). The destruction of the forest and sandfly habitats permits the establishment of vector species in fragmented zones, close to peridomestic zones. In the provinces of Panama, Bocas del Toro, Colón and Veraguas, the sampling locations are subjected to rain throughout most of the year, while the wet and dry periods in other regions are clearly defined. The overall temperature varies by two degrees between regions. We did not examine the link between climate variables and species diversity in this study because of the high variability in climate throughout the day and between days. However, we may consider performing a further analysis of variations in climate and sandfly abundance over time in order to observe temporal distribution patterns and ecological niches.

As observed in the present study, the abundance of sandfly species was greater in locations with environments fragmented by human activities. Other authors have reported that *Lu. longipalpis* has a wide geographical distribution (Souza et al. 2009) and is abundant in anthropic environments (Oliveira et al. 2006). Other species, such as *Lutzomyia withmani*, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia olmeca olmeca*, vectors of ACL agents in different regions of Latin America, are also abundant in degraded areas or those that have been altered by agriculture and cattle (Travi et al. 2002, Andrade Filho et al. 2007, Salomón et al. 2008, Virgens et al.

2008, Pech-May et al. 2010). Therefore, it has been suggested that the creation of new habitats (stables, chicken ranges, orchards etc.), new food sources and the accumulation of organic material from domestic animals, in addition to the conditions of microclimates (temperature and humidity) of these ecotopes, favour the life cycle of sandflies and support their population growth in these habitats (Souza et al. 1999, Dias et al. 2003, Muniz et al. 2006, Monteiro et al. 2008).

The sex ratio analysis suggests that females are more prevalent than males in almost all locations. This is very important in terms of the population ecology because the growth and fitness of the sandfly population depends on the number of females. The estimated sex ratio should be considered when studying the best methods for efficient control of the sandfly population.

The diversity calculated for each individual location was low, especially considering that the values for the Shannon-Weiner index varied from 0-5. However, the results obtained in 35% of the locations indicated a remarkable coexistence of several vector species in different locations. A high diversity was also observed in rural and fragmented locations while a greater dominance was observed in the forest, indicating the prevalence of a single species in this type of environment.

When zoophilic species are included in the analysis, we observed an increase of diversity in the forest environment, greater dominance in the fragmented environment and similarities between the rural and fragmented environments. This may be because *Lu. camposi* and *Lu. dysponeta* were more abundant in those environments and therefore affected the weighting of the index. Based on our experimental design, we cannot say if these two species or other zoophilic species could be involved in transmission of leishmaniasis. Further research into the vector competence and anthropophily rates of these species is required in order to determine if they participate

in the epidemiology of the disease. We have not found any reports of visceral leishmaniasis despite the presence of *Lu. longipalpis* found in the community of Limon; the isolation of *Lu. longipalpis* is interesting because little is known about this species in Panama. We also did not find any reports of visceral leishmaniasis related to cases of cutaneous leishmaniasis.

Sandfly species, especially those that transmit leishmaniasis, have a high tendency to dominate degraded environments despite microclimatic changes, demonstrating their ability to adapt (Peterson & Shaw 2003). The data on diversity and dominance of species in fragmented and rural environments of Panama obtained in this study suggest that these sandfly species are in the process of adapting to the gradual changes in landscape.

Therefore, human activities had a positive effect on vector species for leishmaniasis in Panama. Considering that there is no information on the diversity of sandflies in Panama prior to forest fragmentation, the results obtained in this study may serve as a baseline for future monitoring of the effects of the changing environment on the incidence of ACL in Panama.

Because the frequency of *Lu. panamensis*, *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* varies between the different types of environment, it seems likely that the reduction and fragmentation of forested landscapes influence the abundance and the composition of sandfly species. These changes in the sandfly species could be due to migration from forested to fragmented environments or through the adaptation of sandflies to new habitats. Additionally, the association of *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi* with fragmented environments suggests that these species may be better able to adapt to environmental alterations. The association of *Lu. panamensis*, *Lu. olmeca bicolor* and *Lu. ylephiletor* with the forested landscapes indicates that these species may prefer the conditions of this environment.

In conclusion, multiple factors affect the distribution, abundance and diversity of sandflies. Fragmentation of forests due to increased agricultural activity in Panama may be influencing the geographic distribution of three species of sandflies that are vectors of ACL agents in the country

TABLE II

Comparison mean of sandfly vector trapped in three different characteristic landscapes in Panama, January-June 2010

Species	Landscape		
	Forest	Fragmented	Rural
<i>Lutzomyia panamensis</i> <sup>c</sup>	0.93 <sup>b</sup>	2.27 <sup>a</sup>	1.11 <sup>b</sup>
<i>Lutzomyia gomezi</i> <sup>c</sup>	0.27 <sup>b</sup>	1.59 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>
<i>Lutzomyia trapidoi</i> <sup>c</sup>	0.47 <sup>b</sup>	1.98 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>
<i>Lutzomyia ylephiletor</i>	0.04	0.09	0.04
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	0.01	0.21	0.04
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	0.04	0.1	0.09
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	0	0.05	0.54
<i>Lutzomyia carrerae</i>	0	0.13	0
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0.05	0.05	0

a, b: distinct letters on the same line indicate significant differences in multiple comparison (alpha: 0.05); c: significant differences in Kruskal Wallis test (alpha: 0.05).

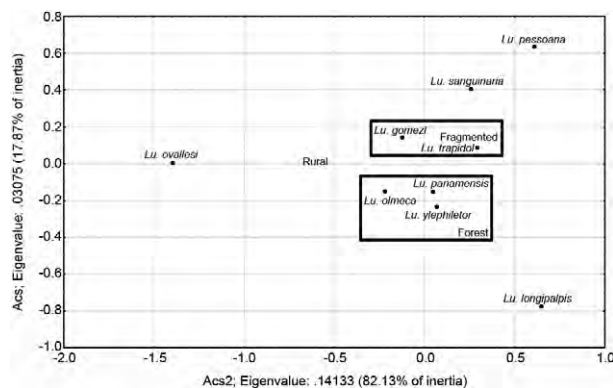


Fig. 2: simple correspondence plot showing the association of number of sandfly vector species (.) trapped for each characteristic landscape (forest, fragmented, rural) in Panama. Acs: analyses correspondence simple.

(*Lu. panamensis*, *Lu. gomezi* and *Lu. trapidoi*). Analysis of species abundance and diversity showed that more than one vector species is often present in rural and fragmented locations where there have been cases of leishmaniasis. Although there is an absence of historical data that would allow us to compare the past and present sandfly populations in a quantitative manner, this study allows us to describe the current sandfly population and will enable us to evaluate the long-term effects of deforestation on the sandfly population and transmission of leishmaniasis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To SENACYT, Instituto Commemorativo Gorgas ICGES and Smithsonian Tropical Research Institute, for logistic support in the collection of sandflies in Panama, to the assistant Yajaíra Perez Alvarez, for her help in field and lab work, to Roberto Rojas, for sort of specimens, to Prof Dr Paulo Roberto Cecon (UFV), for the review statistical analyses, and to José J Lelis Leal de Souza, for his help in the map.

#### REFERENCES

- Aguar GM, Medeiros WM 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In EF Rangel, R Lainson, *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz Rio de Janeiro, p. 207-255.
- ANAM - Autoridad Nacional del Ambiente 2000. *Primer informe de la riqueza y estado de la biodiversidad de Panamá*, ANAM, Panamá, 174 pp.
- ANAM - Autoridad Nacional del Ambiente 2009. *Informe del Estado del ambiente*, ANAM, Panamá, 155 p.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 481-487.
- Azpurua J, de la Cruz D, Valderrama A, Windsor D 2010. *Lutzomyia* sandfly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e627.
- Carvalho GML, Falcão AL, Andrade Filho JD 2006. Taxonomic revision of phlebotomine sandfly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 129-136.
- Chanotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM 1971a. Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotominae sandflies in Panama. *J Med Entomol* 8: 415-420.
- Christensen H 1972. Check list of the Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosq News* 32: 89.
- Christensen H, Fairchild GB, Herrer A, Johnson C, Young D, de Vásquez A 1983. The ecology of cutaneous, leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 20: 463-484.
- Christensen H, Johnson C, Vasquez AM 1984. Leishmaniasis cutánea en Panamá: un breve resumen. *Rev Med Panama* 9: 182-1987.
- Christensen HA, Herrer A, Telford SR 1972. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. II. Entomological investigations. *Ann Trop Med Parasitol* 66: 55-66.
- Dias FO, Lorosa ES, Rebêlo JM 2003. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saude Publ* 19: 1373-1380.
- Grillet ME 2000. Factors associated with distribution of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae) in a malarious area, northeastern Venezuela. *J Med Entomol* 37: 231-238.
- Herrer A 1971. *Leishmania heritigi* sp.n. from the tropical porcu-spine, *Coendou rothschildi*. *J Parasitol* 57: 626-629.
- Herrer A, Christensen HA 1973. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 25: 54-58.
- Herrer A, Christensen HA 1976. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 25: 59-63.
- Herrer A, Telford S, Christensen HA 1971. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama I: investigation of the infection among forest mammals. *Ann Trop Med Parasitol* 65: 349-358.
- Jiménez AE, Rojas JC, Vargas F, Herrero MV 2000. Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. *J Med Entomol* 37: 216-221.
- Magurran AE 1988. *Ecological diversity and its measurement*, Princeton University Press, Princeton, 179 pp.
- Méndez E 1999. *Insectos y otros artrópodos de importancia médica y veterinaria*, Impresora Pacífico, Panama, 45 pp.
- MINSA - Ministerio de Salud del Perú 2005. *Situación Nacional de Salud, Dirección Nacional de Políticas de Salud*, MINSA, Lima, 57 pp.
- Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaría G, Mendoza Y, Calzada J 2009. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 81: 565-571.
- Monteiro WM, Neitzke HC, Lonardon MV, Silveira TG, Ferreira ME, Teodoro U 2008. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do estado do Paraná, sul do Brasil. *Cad Saude Publ* 24: 1291-1303.
- Muniz LHG, Rossi RM, Nietzke HC, Monteiro WM, Teodoro U 2006. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev Saude Publ* 19: 1087-1093.
- Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espindola IAC, Dorval MEC, Brazil RP 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 869-874.
- Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Med Vet Entomol* 24: 150-161.
- Peterson AT, Shaw JJ 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions and climate change effects. *Int J Parasitol* 33: 919-931.
- Rutledge LC, Ellenwood DA 1975. Production of Phlebotominae sandflies on the open forest floor in Panama: phytologic and edaphic relations. *Environm Entomol* 4: 83-89.
- Salomón OD, Quintana MG, Zaidenberg M 2008. Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 282-287.
- Secombe AK, Ready PD, Huddleston LM 1993. *A catalogue of Old World Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)*, The Natural History Museum, London, 57 pp.
- Service MW 1991. Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. *Rev Saude Publ* 25: 165-178.

- Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1181-1182.
- Souza RN, Lima JWO, Souza FV, Gadelha AC, Braga VSS 1999. Estabelecimento de um criadouro natural de *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 214-215.
- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosq News* 22: 126-129.
- Tesh RB, Chanotis BN, Aronson MD, Johnson KM 1971. Natural host preferences of Panamanian Phlebotominae sandflies as determined by precipitin test. *Am J Trop Med Hyg* 20: 150-156.
- Travi BL, Alder GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J 2002. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forest in northern Colombia. *J Med Entomol* 39: 451-456.
- Virgens TM, Santos CB, Pinto IS, Silva KS, Leal FC, Falqueto A 2008. Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cad Saude Publ* 24: 2969-2978.
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH 1993. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitol* 106: 55-75.
- Young DG, Arias JA 1992. *Flebótomos: vectores de leishmaniasis en las Américas*, Technical Report 33, Organización Pan-Americana de Salud, Washington, 28 pp.
- Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst* 54: 1-881.

## Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama

Anayansi Valderrama<sup>1,3/+</sup>, Mara Garcia Tavares<sup>1</sup>, José Dilermando Andrade Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos/Coleção de Flebotomíneos, Instituto René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil <sup>3</sup>Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá

*Lutzomyia longipalpis* is the primary vector of the parasite responsible for visceral leishmaniasis in the Americas. In the present study, *Lu. longipalpis* was found in a domiciliary area in Limón, a district in Capira, a region in which cutaneous leishmaniasis is endemic in Panama. Previously, this species has been found in a humid forest in this same region. Finding *Lu. longipalpis* in domiciliary areas indicates that this species may be adapting to new habitats and that it may play a role in the transmission of leishmaniasis in Panama.

Key words: *Lutzomyia longipalpis* - cutaneous leishmaniasis - visceral leishmaniasis - leishmania vectors - Panama

*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotominae) is the primary vector of the parasite that causes visceral leishmaniasis in the Americas (Young & Duncan 1994). Leishmaniasis is a disease that principally affects the liver and the spleen. In Panama, approximately 3,000 cases of leishmaniasis per year are registered by the Ministry of Health and by the Gorgas Institute. However, the possibility of underreporting must be considered because the communities in which leishmaniasis is most common are far from health centres (Miranda et al. 2009).

Despite the medical relevance, the taxonomic status of *Lu. longipalpis* has not yet been defined. Studies carried out by Mangabeira (1969) have demonstrated that male specimens of *Lu. longipalpis* from the states of Pará and Ceará (Brazil) exhibit morphological differences in the third and fourth abdominal tergites. Later, several morphological and genetic analyses revealed significant differences among Brazilian populations and those distributed in Central America, Colombia and Venezuela, which led to the proposition of the existence of a species complex (Ward et al. 1983, Lanzaro et al. 1993, Arrivillaga & Feliciangeli 2001, Bauzer et al. 2007, Maingon et al. 2008).

The existence of the *Lu. longipalpis* complex is very important in the epidemiology of leishmaniasis. Zeledón et al. (1989) and Warburg et al. (1994) demonstrated that the transmission of *Leishmania infantum chagasi* by *Lu. longipalpis* in Brazil and Colombia results in visceral infections, whereas the transmission of the same parasite by *Lu. longipalpis* in Costa Rica results in non-ulcerative lesions. Comparative studies on the saliva

of these populations of Phlebotominae revealed differences in the chemical composition and the amount of maxadilan affect the proliferation of *Leishmania* and, consequently, the development of the disease (Warburg et al. 1994, Lanzaro et al. 1999).

The presence of *Lu. longipalpis* in Panamanian forests was first reported in the 1960s (Theodor 1965, Christensen 1972). Currently, however, there is little knowledge of its distribution, occurrence and participation in the transmission of leishmaniasis in Panama. The present study reports, for the first time, the occurrence of *Lu. longipalpis* in a domiciliary area in a region in Panama in which cutaneous leishmaniasis is endemic.

The sampling was carried out in June and August 2010 in Limón, the Campana region, the district of Capira, the province of Panama, in the Republic of Panama. This locality is situated at 8°41'14"N 79°54'3"W at an elevation of 506 m. According to Köepper's classification, the climate in the region is AW tropical wet and dry.

Specimens of Phlebotominae fauna were collected with the help of CDC light traps (Sudia & Chamberlain 1962) using an octanol solution as a supplemental mosquito attractant. The traps were installed in domestic and peridomestic environments at a height of 1.5 m and the collection period lasted 12 h (06:00 pm-06:00 am) for three consecutive nights. The captured individuals were placed on glass slides with the use of Berlese's medium for clarification and identification. The specimens were identified by José Dilermando Andrade Filho (National and International Reference Center for Phlebotomine Sand Flies, Belo Horizonte, MG, Brazil) using the scheme of Young and Duncan (1994).

Five females of *Lu. longipalpis* were collected in June, three inside a house and two in a peridomestic area, close to a henhouse. Two months later, four females and two males were captured in the same peridomestic area. *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia panamensis* and *Lutzomyia trapidoi*, other species implicated as cutaneous leishmaniasis vectors, were also captured in the CDC light

Financial support: SENACYT (COL09-008)

+ Corresponding author: anayvald@yahoo.com

Received 12 May 2011

Accepted 22 September 2011

traps. The ability of *Lu. longipalpis* to adapt to changing environments has been observed in other countries (Souza et al. 2009, Acardi et al. 2010). The presence of *Lu. longipalpis* in domiciliary areas demonstrates that this species can easily adapt to domiciles and adjacent areas, increasing the risk of transmission of leishmaniasis in this region. It must also be highlighted that *Lu. longipalpis* was captured in an area where there was a small population. According to the records of the Ministry of Health, most of these people have already presented clinical manifestations of cutaneous leishmaniasis.

Four specimens of *Lu. longipalpis* were previously collected in Panama, from the forest of the Altos de Campana National Park (Garcés et al. 1999, Valderrama et al. 2008). This national park is a wild area protected by the environmental authorities and is located 16 km from the community of Limón. Therefore, the presence of *Lu. longipalpis* individuals near and inside a home in Limón suggests that this species is adapting to the degraded forest environment, possibly as the result of the search for new sources of food and shelter.

Limón is the oldest area of endemic transmission of cutaneous leishmaniasis in Panama. The occurrence number of this disease in this region is 15 cases per year, according to records of the Ministry of Health for 2009, and 95% of the people infected are non-residents.

It must be stressed that there are no records of visceral leishmaniasis in Panama despite the presence of various mammalian reservoirs of *Le. infantum chagasi* in South America (Rangel & Lainson 2003). In fact, it is common to see several sick dogs roaming in Limón. Given that these dogs could be infected with *Leishmania* parasites, these dogs could increase the risk of the spread of this disease. However, Zeledón et al. (1989) demonstrated that patients infected with *Le. infantum chagasi* by *Lu. longipalpis* in Costa Rica presented non-ulcerative lesions. In addition, Ponce et al. (1991) observed patients with clinical manifestations of both visceral and cutaneous leishmaniasis in the same transmission focus in Honduras. These reports suggest that the transmission of *Le. infantum chagasi* by the species *Lu. longipalpis* in Central America only results in cutaneous lesions.

However, the diagnosis of patients with cutaneous leishmaniasis through conventional tests (Montenegro test) is limited and has no specificity to differentiate the *Leishmania* species (Miranda et al. 2009). Thus, there have been discussions about the cases of cutaneous leishmaniasis detected in Limón as to whether the infections are really caused by *Leishmania* spp transmitted by Phlebotominae sand flies, vectors of cutaneous leishmaniasis recorded in Panama or by species of *Leishmania* transmitted by *Lu. longipalpis*, as observed by Zeledón et al. (1989) and Ponce et al. (1991).

Based on the observations reported and on the presence of *Lu. longipalpis* in Limón, a region in which cutaneous leishmaniasis is endemic in Panama, further studies focused on the ecological and epidemiological factors related to infection caused by *Leishmania* spp are needed. The assessment of *Lu. longipalpis* as a possible vector of leishmaniasis in Limón in particular should be verified because this is an ecotourism region.

Therefore, the detection of *Lu. longipalpis* in houses in areas degraded by deforestation demonstrates the need to intensify entomological surveillance, to constantly monitor the vector species and to evaluate the effect of human activities on sand fly populations and their wild hosts. Further, it is necessary to implement specific diagnostic techniques to differentiate the species of *Leishmania* and implement adequate control measures.

## REFERENCES

- Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD 2010. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 796-799.
- Arrivillaga JC, Feliciangeli MD 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara state, Venezuela. *J Med Entomol* 38: 783-790.
- Bauzer LG, Souza NA, Maingon RD, Peixoto AA 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 1-12.
- Christensen HA 1972. Check list of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Panama including two species not previously reported. *Mosq News* 32: 88-89.
- Garcés P, Araúz E, Morales Z 1999. Determinación de Phlebotominae: *Lutzomyia* spp, en un área boscosa del Parque Nacional Altos de Campana, Distrito de Capiro, Provincia de Panamá. *Scientia* 2: 35-47.
- Lanzaro GC, Lopes AHCS, Ribeiro JMC, Shoemaker CB, Warburg A, Soares M, Titus RG 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 8: 267-275.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg* 48: 839-847.
- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA 2008. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends Parasitol* 24: 12-17.
- Mangabeira O 1969. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malariol D Trop* 21: 3-25.
- Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaría G, Mendoza Y, Calzada J 2009. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 81: 565-571.
- Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D, Neva F 1991. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet* 337: 67-70.
- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In EF Rangel, R Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-310.
- Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1181-1182.

- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosq News* 22: 126-129.
- Theodor O 1965. On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* 2: 171-197.
- Valderrama A, Herrera M, Salazar A 2008. Relación entre la composición de especies del género de *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. *Acta Zool Mex* 24: 67-78.
- Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus R, Neva F 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and propensity to enhance leishmaniasis. *Phil Trans Roy Soc Lond* 345: 223-230.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas, and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 269-280.
- Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* 54: 1-881.
- Zeledón R, Hidalgo H, Viquez A, Urbina A 1989. Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 786.

**Intercâmbio genético e reconstrução histórica das populações  
de *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Phlebotominae) no istmo de  
Panamá**

## Resumo

*Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931) é um dos principais vetores de *Leishmania* (*Vianna*) *panamensis* no Panamá e apesar da sua importância médica, não existem estudos de genética populacional com esta espécie. No presente trabalho utilizou-se sequências do gene mitocondrial citocromo B/início da NADH1 e do gene do fator de alongação nuclear  $\alpha 1$ , para analisar a variabilidade genética, estrutura populacional e filogeografia de populações de *Lu. gomezi*. Oitenta e seis indivíduos de *Lu. gomezi*, amostrados em 38 locais de ocorrência de leishmanioses em distintas regiões no Panamá, foram analisados. Foram identificados 37 e 26 haplótipos para o gene mitocondrial e nuclear, respectivamente. As diversidades haplotípica e nucleotídica foram de  $h=0,80-1,0$  e  $\pi=0,005-0,013$  para o gene mitocondrial e  $h=0,43-0,62$  e  $\pi=0,002-0,004$  para o gene nuclear. As análises demonstraram que, com exceção da população localizada na região de Bocas del Toro, as demais populações não apresentaram evidências de estruturação genética, o que pode ser explicado pela existência de fluxo gênico entre as populações da mesma região e até mesmo entre populações de regiões distantes. Os dados obtidos reforçam a capacidade de migração e adaptabilidade das populações de *Lu. gomezi* às mudanças ambientais e, conseqüentemente, a importância desta espécie como transmissor da leishmaniose cutânea no Panamá. Os resultados obtidos, além de fornecerem importantes informações sobre a genética populacional de *Lu. gomezi* também poderão ajudar no planejamento de estratégias de controle do vetor relacionando essa diversidade de alelos com o aumento no número de casos da doença.

**Palavras chaves:** Flebotomíneos, *Leishmania panamensis*, leishmanioses cutânea, variabilidade genética, filogeografia

## Introdução

*Lutzomyia (Lutzomia) gomezi* (Nitzulescu, 1931) é vetor de *Leishmania (Vianna) panamensis* no Panamá, principal causador de leishmaniose cutânea (Christensen et al. 1972, 1983, 1984). Na América Central *Lu. gomezi* está presente desde México até o Panamá, tendo sido recentemente registrado na Guatemala (Vivero et al. 2011). Na América do Sul, sua presença já foi registrada na Colômbia, Venezuela, Equador e no Norte do Brasil, nos estados do Acre e Amazonas (Martins et al. 1978, Azevedo et al. 2008, Gomes et al. 2009). Essa e outras espécies de *Lutzomyia* têm sido associadas a vários focos de infecção de leishmaniose cutânea na América Central e em alguns países da América do Sul (Christensen et al. 1983, Jaramillo et al. 1994, Jimenez et al. 2000, Bejarano et al. 2002, Santamaría et al. 2006, Vivero et al. 2011).

O habitat natural de *Lu. gomezi* é a floresta tropical úmida, sendo registrada em maior densidade em áreas abertas, dentro da floresta e no dossel (Chaniotis et al. 1971, Christensen et al. 1983). Sua atividade é crepuscular e noturna com horários de hematofagia entre as 18 - 20 horas (Chaniotis et al. 1971). Entretanto, com o desmatamento e a perda do seu habitat natural, esta espécie vem adaptando-se as áreas peridomiciliares, onde podem alimentar-se de uma grande variedade de animais domésticos (Travi et al. 2002, Valderrama et al. 2011). Nos focos de infecção esta espécie é mais dominante nos peridomicílios do que dentro das casas, o que dificulta seu controle (Christensen et al. 1983, Feliciangeli & Rabinovich 1998, Travi et al. 2002, Duque et al. 2004, Cortés & Fernández 2008).

Apesar da importância de *Lu. gomezi* como vetor de *Leishmania*, trabalhos enfocando aspectos genéticos ou a presença do parasita no vetor dessa espécie são raros. Jorquera et al. (2005), por exemplo, detectaram a infecção natural com espécies de *Leishmania* em espécimes de *Lu. gomezi* na Venezuela, enquanto Vivero et al. (2007) analisaram as mudanças na estrutura primária e secundária do tRNA<sub>ser</sub> dessa espécie para fins taxonômicos, e Azpurua et al. (2010) detectaram espécimes de *Lu. gomezi* infestados com *L. naiffi*, no Panamá, o que gerou diversas hipóteses sobre a introdução da *L. naiffi* neste País.

Assim, torna-se importante avaliar qual é o efeito das mudanças ambientais sobre a diversidade genética das espécies vetoras e como essa alteração interfere na competência vetorial para agentes patogênicos ou na resistência das espécies aos inseticidas (Lourenço-de-Oliveira et al. 2004, Black IV & Tabachnick 2004). Por outro lado, estudos populacionais podem demonstrar a capacidade de migração, reprodução e

adaptação das espécies às condições do novo habitat, implicando na emergência ou re-emergência de doenças (Reisen et al. 1997). Além disso, a determinação de espécies crípticas e sua habilidade de transmitir patógenos são cada dia mais relevantes para entender suas implicações na epidemiologia de doenças e sugerir programas de prevenção e controle adequados, eficientes e sem riscos ambientais (Black IV & Tabachnick 2004).

Considerando a inexistência de estudos populacionais com a espécie *Lu. gomezi* no Panamá e nas Américas como um todo, o presente trabalho tem como objetivo estimar e comparar a variabilidade genética intra e inter populacional de *Lu. gomezi* em regiões com alta incidência de leishmaniose cutânea no Panamá. Pretende-se também, identificar as possíveis barreiras que podem influenciar o fluxo gênico entre as populações de *Lu. gomezi*. Esses dados poderão contribuir para melhorar o desenvolvimento de estratégias de controle de vetores da leishmaniose no Panamá.

## **Materiais e métodos**

Os indivíduos de *Lu. gomezi* foram coletados em 38 localidades do Panamá, nas estações seca (janeiro/abril) e chuvosa (maio/junho) de 2010. Trinta e quatro dessas localidades foram selecionadas porque representavam locais onde ocorreram relatos de leishmaniose cutânea em humanos, durante o período de 2006 a 2009, segundo dados do Departamento de Epidemiologia do Ministério de Saúde de Panamá. As características paisagísticas dessas localidades permitiram a classificação das mesmas em: ambiente fragmentado (vegetação secundária e áreas utilizadas para a atividade agrícola) ou rural (área sem grande concentração de pessoas). As localidades Parque Nacional Coíba, Parque San Lorenzo, Parque Camino del Oleoducto e Parque Serrania Filo del Tallo representam reservas naturais (florestas) protegidas pela Autoridade Nacional do Ambiente (ANAM) e foram selecionadas como controle (Tabela 1).

A distribuição geográfica das localidades amostradas é apresentada na Fig.1. Na Tabela1 descrevem-se os locais caracterizados segundo a paisagem e microhabitat e os haplótipos encontrados em cada localidade amostrada.

Para as coletas dos adultos de *Lu. gomezi* nos locais fragmentados e rurais, as armadilhas de luz CDC (Sudia & Chamberlain 1962) foram colocadas no peridomicílio, próximas de abrigos de animais domésticos e vegetação arbustiva. Nas reservas, as armadilhas foram colocadas próximas a ninhos de animais, fendas de pedras, buracos no solo e ocos de árvores.

Nove armadilhas de luz CDC foram colocadas em cada ponto, a 1,5 m de altura, com uma distância de 50 metros uma da outra. O período de captura foi de 12 horas (18-6 horas), durante dois dias consecutivos, em cada local. Os flebotomíneos foram mortos com clorofórmio, preservados em álcool 95% e armazenados a -20°C. Os indivíduos foram identificados segundo os critérios taxonômicos de Young & Duncan (1994).

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo de Michalsky et al. (2002), com algumas modificações. Cada indivíduo foi homogeneizado em tampão de lise (100 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) e enzima protease 20 mg/ml e incubado a 37°C *overnight*. O DNA foi purificado com fenol:clorofórmio:isoamílico (26:25:1), seguido da precipitação do pellet com acetato de sódio 3M, pH 5,2 e etanol absoluto frio e final etanol 70%. O DNA genômico foi ressuspensionado em 20 µl de TE (10 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 1Mm EDTA pH 8,0) e armazenado a -20°C até seu uso.

Os primers empregados para a amplificação da sequência de 501 nt do mtDNA foram: CB3-PDR 5'-CA(T/A)ATTCAACC(A/T)GAATGATA-3'/N1N-PDR 5'-GGTA(C/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA-3' (Ready et al. 1997). Esses primers amplificam uma sequência de 294 nt correspondente ao final do Cytb, 4 nt da região intergênica IGS-1, 68 nt do tRNA-Ser, 16 nt da região intergênica IGS-2 e 119 nt do início de gene NADH1. Para uma reação de PCR (25 µl) foram utilizados 50 ng de DNA genômico, tampão (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, primers (10pM) e 1U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Ready et al. (1997). O produto de amplificação foi separado em um gel de agarose a 1,5%.

Para a análise do fragmento de 597 nt do fator de alongação nuclear alfa-1 (EF-α1), região parcialmente codificadora foram utilizados os primers EF-F03 5'GCTCCTGGACATCGTGA(T/A)TT-3 e EF-R04 5'AGTGCTTCGTGGTTGTAT(C/T)TC-3' (Testa et al. 2002). As condições de amplificação foram detalhadas em Parvasi & Assmar (2007). Para uma reação de 25 µl de volume final, foram utilizados 50 ng de DNA genômico, tampão (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, primers (10mM) e 1,25U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega).

Um controle negativo foi incluído em cada reação de PCR. Os produtos das amplificações foram sequenciados diretamente pela Macrogen Inc (Coreia do Sul). nas duas direções, com os mesmos primers utilizados nas amplificações. As sequências foram comparadas com a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

nucleotide disponível no GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) para verificar a similaridade entre as sequências de *Lu. gomezi* armazenadas na base de dados.

As análises populacionais e filogeográficas, utilizando o gene mitocondrial, foram realizadas após concatenação das sequências correspondentes às regiões codificadoras dos genes Cyt b e NADH1, por serem mais informativas do que a sequência completa. O software CodonCode Aligner foi utilizado para editar as sequências nucleotídicas e identificar os indivíduos heterozigotos do marcador nuclear. Posteriormente, essas sequências foram alinhadas com a opção Muscle incluída no software MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011).

Para realizar as análises, indivíduos coletados em locais geograficamente próximos foram agrupados em diferentes populações. Desta forma, os exemplares coletados em Bocas del Toro representaram a população do Oeste do Panamá, enquanto aqueles coletados em Veraguas, Coclé, Colón e Panamá Oeste representaram a população do Panamá Central e os provenientes de Panamá Leste, Darién, San Blas formaram a população do Panamá Leste. A Ilha Coíba não foi incluída na análise populacional porque se coletou um único indivíduo nessa localidade (Fig. 1).

Os softwares DnaSP 5 (Librado & Rozas 2009) e Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005) foram utilizados para estimar o número de haplótipos, a diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ), para cada população. Para a reconstrução dos haplótipos, considerando os heterozigotos detectados no gene nuclear, foi utilizado o modelo de recombinação na opção PHASE incorporado no DnaSP 5. Além disso, o software Arlequin 3.11 foi utilizado para calcular, para cada região, os testes de neutralidade de Tajima D (Tajima 1983) e de Fu Fs (Fu 1997) e para verificar a ocorrência de expansão populacional, com permutações de 1000 vezes (Excoffier et al. 2005).

Para estimar a diferenciação genética entre as populações foi realizada a comparação par a par, com permutações não paramétricas de 10 000 vezes e significância de  $p=0.01$ , com auxílio do software Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Para a verificação da estrutura populacional calculou-se a análise de variância molecular (AMOVA - Weir & Cockerham, 1984, Excoffier et al. 1992) com permutações não paramétricas de 10 000 vezes e nível de significância de  $p=0.01$ . A taxa de migração foi calculada com a fórmula  $Nm \approx \frac{1}{4}(1/fst-1)$  para dados diplóides e  $Nm \approx \frac{1}{2}(1/fst-1)$  para dados haplóides.

Para a estimação de uma possível correlação linear entre a distância genética e a distância geográfica, utilizou-se o teste de Mantel, implementado no programa Alleles

in Space (Miller 2005).

A rede de haplótipos para ambos os genes foi inferida mediante o método de median-joining network (Bandelt et al. 1999), utilizando o software Network v.4.5 ([HTTP://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)). Para obter os valores das probabilidades *a posteriori* entre os cladogramas, a análise Bayesiana foi realizada utilizando-se o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist, 2001). O programa MrModelTest (Nylander et al., 2004) foi utilizado para determinar o modelo de substituição nucleotídica, segundo o critério AIC (Akaike Information Criterion). Para a análise foram utilizados 10 milhões de gerações para cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) e burn-in de 5 milhões.

## Resultados

Para o gene mitocondrial foram obtidas 86 sequências contendo 419 nucleotídeos. Dessas, 38 sítios foram polimórficos e 19 apresentaram uma única substituição (singleton). A composição nucleotídica desse gene foi: 38%T, 15%C, 37%A e 10%G, sendo rica em A-T (75%). Para o gene nuclear EF- $\alpha$ 1 foram obtidas 166 sequências de 597 nucleotídeos, considerando-se os heterozigotos obtidos com o modelo de recombinação na opção PHASE. Para este gene, detectou-se 33 sítios polimórficos, 6 singleton e uma maior proporção de G-C (53%): 23%T, 27%C, 23%A e 27%G.

Um total de 36 e 26 haplótipos foram identificados para as sequências mitocondriais e nucleares, respectivamente (Tabela 1). Os números de haplótipos, a diversidade haplotípica ( $h$ ) e a nucleotídica ( $\pi$ ), encontradas para cada uma das populações são mostradas na Tabela 2.

Na rede de haplótipos para o gene mitocondrial (Fig. 2) observou-se a presença de dois cladogramas distintos (A e B), apesar de não existir uma estruturação geográfica definida entre eles. No clado A, o haplótipo mais freqüente (H5) foi encontrado nas amostras das populações do Panamá Central e Leste. Os demais haplótipos derivaram deste, a partir de 1 a 3 passos mutacionais. Na ilha Coíba observou-se um haplótipo único (H6). Também se observou nesse clado a presença de um subgrupo constituído pelos haplótipos H22, H14, H30 e H33, sendo os dois primeiros, os mais freqüentes e compartilhados entre espécimes coletados também nas populações do Panamá Central e Leste, provavelmente por serem locais geograficamente próximos. No clado B observou-se quatro haplótipos (H1, H2, H3 e H4) presentes exclusivamente na

população do Oeste do Panamá.

A rede de haplótipos do gene nuclear (Fig. 3) também não evidenciou uma estrutura geográfica definida. A partir do haplótipo H1, que foi o mais freqüente, vários outros haplótipos compartilhados entre espécimes geograficamente próximos, derivam-se por 1 ou 2 passos mutacionais. Os haplótipos H7 e H11, presentes exclusivamente na região Central do Panamá, por sua vez, apresentaram-se separados dos demais haplótipos da rede por 3 a 4 passos mutacionais.

A AMOVA (Tabela 3) indicou que a maior parte da variação genética total detectada ocorre dentro das populações, tanto para o gene mitocondrial (77.4%) quanto para o gene nuclear (90.8%) (Tabela 3) e, os valores de  $F_{st}$  encontrados evidenciaram que existe forte estruturação genética entre as mesmas. Essa diferenciação foi comprovada nas análises de comparações par-par (Tabela 4). Diferenças significativas ( $P < 0.01$ ) foram encontradas entre as três populações quando o gene mitocondrial foi analisado. As análises com o gene nuclear também evidenciaram diferenças significativas entre as populações do Panamá Central e Leste (Tabela 4). A taxa de migração ( $Nm$ ) entre essas regiões também é mostrada na Tabela 4. Os valores negativos na comparação par a par foram considerados 0 e na taxa de migração, como infinitos.

Os testes de neutralidade foram não-significativos, para ambos os genes, isto é, eles não detectaram mudanças no tamanho das populações, ao longo do tempo (Tabela 2).

O modelo obtido pelo MrModeltest para a análise de inferência Bayesiana foi HKY+I, com proporção de sítios invariáveis ( $I$ ) = 0,7594. A árvore filogenética Bayesiana para o gene mitocondrial *cytb*-NADH1 mostrou a formação de três grupos principais, com probabilidade *a posteriori* de 0,99-1,0 (dados não mostrados), além de outros ramos menores, suportados por baixos valores de probabilidades *a posteriori*. Os grupos com maior probabilidade *a posteriori* corroboraram a falta de estruturação geográfica obtida na rede de haplótipos, inferida mediante o método de median-joining (Fig. 2). Para gene nuclear o modelo obtido foi K80+I, com proporção de sítios invariáveis ( $I$ ) = 0,6725. A inferência Bayesiana também não revelou uma estruturação geográfica.

O teste de Mantel mostrou uma correlação significativa, porém, muito baixa ( $r = 0,20$ ;  $p < 0,001$ ) apenas para o com o gene mitocondrial.

## Discussão

*Lutzomyia gomezi* tem uma ampla distribuição geográfica no Panamá e essa distribuição possivelmente está relacionada com mudanças paisagísticas devido ao desmatamento (Valderrama et al. 2011). Assim, nesse trabalho populações de *Lu. gomezi* foram analisadas para avaliar sua variabilidade e estrutura populacional, que são parâmetros importantes para o controle desse vetor. Adicionalmente, buscou-se interpretar como o surgimento do istmo do Panamá, considerado parte do “hotspot” mesoamericano, funcionou como ponte de convergência de diversos organismos para esta região, incrementando a biodiversidade da flora e fauna e permitindo o estabelecimento dos flebotomíneos na mesma.

O alto conteúdo de A-T (74%) do gene mitocondrial de *Lu. gomezi* está de acordo ao já verificado em outros insetos (Simon et al. 1994) e, em particular, ao verificado em sequências do mesmo fragmento de *Phlebotomus papatasi* e *Lu. evansi* (Hamarshah et al. 2007, Bejarano et al. 2009). Isto sugere uma alta taxa de substituições sinônimas no DNA mitocondrial (Ticher & Graur 1989). Da mesma forma, a proporção de G-C (53%) encontrada para o gene nuclear em *Lu. gomezi* foi similar aquela verificada em *Anopheles gambiae* (45%) e *Culex pipiens* (63%) e é típico dos introns (Calcagnotto 2001, Nahum 2001).

A baixa correlação detectada pelo teste de Mantel revelou que a variação genética encontrada nas populações de *Lu. longipalpis* distribuídas no Panamá, não é devido ao isolamento geográfico. Entretanto, quando considera-se que a diferenciação das populações de Panamá Oeste (Bocas del Toro), a Cordilheira Central, com montanhas de 2468 a 3475 metros acima do nível do mar, pode estar funcionando como uma barreira geográfica para a distribuição altitudinal do *Lu. gomezi* que, normalmente, é de 175-300m de altitude (Añez et al. 1988). Similarmente, as diferenças genéticas encontradas entre as populações de *Anopheles albimanus* da Costa Rica e Panamá também foram atribuídas à Cordilheira da América Central, que abrange a Cordilheira de Talamanca e a Cordilheira Central (Molina-Cruz et al. 2004).

Por outro lado, a diferenciação genética detectada entre as populações de flebotomíneos proveniente das regiões Panamá Leste e Panamá Central, separadas uma das outra pela bacia do Canal de Panamá, pode ser explicada por variações climáticas específicas ocasionadas pelo istmo do Panamá. Devido à localização deste em uma zona de convergência intertropical, as chuvas possuem amplitude bem diferente de um ano para outro e de uma região a outra, estabelecendo três tipos de clima tropical Af (muito

úmido), Ami (úmido), Awi (seco), segundo a classificação Köppen (ETESA). Nas regiões coletadas da província de Veraguas, Coclé, Colón e Panamá (a oeste da província de Panamá), por exemplo, nos últimos 10 anos, registraram-se precipitações e temperaturas entre 3001-3500 mm e 22°C-24°C respectivamente, enquanto na região Leste do Panamá a quantidade de chuva e a temperatura registradas variaram entre 1000-1800 mm e 26°C-27°C. Variações climáticas também foram utilizadas por Ready et al. (1998) para justificar as diferenças genéticas encontradas entre populações brasileiras de *Lu. whitmani*.

Em conjunto, as variações climáticas e a topografia no Panamá fornecem elementos que mantêm uma heterogeneidade vegetacional no País, que também pode ajudar a explicar a diferenciação genética detectada entre algumas populações. A diferenciação genética observada entre as populações do Panamá Leste e Central, por exemplo, pode ocorrer porque indivíduos foram obtidas em regiões com vegetação de floresta tropical de terras baixas, enquanto as populações de Panamá Leste ocorrem em áreas de florestas com evidente impacto antropogênico.

O padrão filogeográfico de *Lu. gomezi*, também pode estar relacionado com a migração dos hospedeiros dos flebotomíneos, principalmente com a de mamíferos. Muitas espécies de mamíferos (Canidae, Procyonidae, Sciuridae, Didelphidae, Dasypodidae) que são hospedeiros dos flebotomíneos na atualidade estabeleceram-se no Panamá durante a migração Norte-Sul ocorrida durante a constituição do istmo entre o Mioceno-Plioceno (Coates & Obando 1996, Cox 2000, Webb 2006). Considerando que os flebotomíneos adultos, normalmente, dispersam-se por distâncias de 57 a 300 metros (Christensen et al. 1983, Alexandre et al. 1992, Morrison et al. 1993), a ausência de estruturação geográfica no clado A evidencia que os indivíduos de *Lu. gomezi* poderiam estar dispersando-se de uma população para outra, mesmo se elas estiverem isoladas por quilômetros. Assim, sugere-se que esta dispersão entre longas distâncias poderia ser gradual e assistida pelo vento, pela mobilização passiva de ovos e larvas.

Adicionalmente, registros fósseis do Mioceno demonstraram a presença de flebotomíneos em fragmentos de pêlos de mamíferos e em microestruturas da plumagem de aves na República Dominicana (Peñalver & Grimaldi 2005). Essas evidências sugerem que além de servir de fonte alimentar para os flebotomíneos, esses hospedeiros podem servir como vias de locomoção levando ao flebotomíneos presos no pêlo do hospedeiro mamífero. Porém, estudos entre ecótopos distantes utilizando outros marcadores moleculares são necessários para definir essa capacidade de dispersão do vetor.

A detecção do haplótipo H6 no Parque Nacional de Coíba (Veraguas), provavelmente derivado do haplótipo H10, detectado tanto nas populações do Panamá Central quanto do Leste, indica uma possível migração de *Lu. gomezi* a partir do continente. Coíba foi uma ilha continental que se deslocou a partir da América do Sul no Eoceno, ficando próxima ao istmo do Panamá devido à diminuição do nível do mar na última glaciação. Isso pode ter permitido a migração de animais silvestres e, posteriormente, quando o nível do mar subiu, Coíba foi isolada (Heckadon 2001, Hoernle et al. 2002). Esses fatores podem ter isolado esse haplótipo, além de ser mais uma evidência de que hospedeiros silvestres podem ajudar na dispersão desses vetores.

Por outro lado, as evidências de pólen de várias espécies de Angiospermas indicam alternâncias de períodos secos e úmidos nas terras baixas do Panamá (Grimm et al. 2001). As oscilações climáticas acontecidas na transição do Pleistoceno-Holoceno e o incremento de temperatura no Holoceno, similares às condições atuais, possibilitaram o estabelecimento de um tipo vegetacional que até hoje persiste na bacia do Gatún, Valle e Yeguada, localizadas na região Central do Panamá (Piperno et al. 1990, Brush et al. 1992).

Assim, possivelmente, o surgimento do istmo do Panamá, sua posição geográfica e as variações climáticas acontecidas durante este período foram os principais fatores que permitiram o estabelecimento de diferentes espécies nesta região, contribuindo para a biodiversidade no Panamá, hoje considerado parte do “hotspot” mesoamericano. Com relação especificamente à *Lu. gomezi*, as condições presentes durante o surgimento do istmo podem ter sido favoráveis para sua adaptação às diferentes condições ecológicas existentes no território panamenho.

Apesar da baixa diversidade nucleotídica, os resultados dos testes de neutralidade sugerem que o tamanho das populações de *Lu. gomezi* mantém-se estável ao longo do tempo, possivelmente devido ao equilíbrio na taxa de nascimentos e mortalidade dos indivíduos das populações. Isto pode ser explicado porque, nos dias atuais, com a fragmentação da floresta e a destruição do habitat natural dos flebotomíneos por atividades antropogênicas registradas desde épocas pré-colombiana no Panamá (Linares 1975, Piperno & Jones 2003), os flebotomíneos adaptados às variações ambientais extremas características do Holoceno estão migrando da floresta para áreas fragmentadas e ambientes domiciliares, na procura de recursos e abrigos (Marquez et al. 2001, Travi et al. 2002, Andrade Filho et al. 2007, Virgens et al. 2008, Salomón et al. 2006, Pech et al. 2010). A prevalência dos haplótipos 5 (mtDNA) e 1 (nDNA), possivelmente ancestrais, e o compartilhamento desses por indivíduos

presentes em ambientes peridomiciliar e florestal evidenciam a origem silvestre dessas populações e o deslocamento de *Lu. gomezi* para a vegetação arbustiva, além de sua capacidade de se adaptar às mudanças causadas pela fragmentação florestal.

No Panamá, o contágio da doença acontece principalmente na floresta e, por enquanto, não existem evidências de contágio domiciliar. Considerando a expansão geográfica de *Lu. gomezi*, a associação dessa espécie aos ambientes fragmentados (Valderrama et al. 2011) e a presença no peridomicílio em 89% dos locais amostrados, sugere-se que essa espécie se adapta bem às mudanças ambientais, o que torna possível o risco de infecção domiciliar. Dessa forma, as populações peridomiciliares de *Lu. gomezi* podem estar contribuindo para o aumento do número de casos de leishmaniose cutânea, nas diferentes regiões estudadas e, o ciclo epidemiológico da leishmaniose cutânea pode estar sendo mantido por populações silvestres, como já observado para *Lu. longipalpis* (Marquez et al. 2001). Seria necessário, entretanto, analisar a infecção natural do vetor para confirmar essa hipótese.

Concluindo, o estabelecimento de *Lu. gomezi* no Panamá pode ter sido facilitado pelo intercâmbio de mamíferos no continente Americano e pelas condições vegetativas e climáticas típicas do País, apesar da existência de barreiras geográficas, como a Cordilheira Central. Adicionalmente, os dados obtidos nesse estudo reforçam a capacidade de migração e adaptabilidade das populações de *Lu. gomezi* às mudanças ambientais que estão sendo registradas no Panamá, desde a época pré-colombiana. A relevância de *Lu. gomezi* como transmissor da leishmaniose cutânea no Panamá, portanto, pode estar sendo subestimada, principalmente se considerarmos que as populações silvestres desse vetor podem estar contribuindo para a manutenção da doença. Desta forma, torna-se necessário avaliar se a variabilidade genética das populações estudadas no Panamá, tem influência na capacidade vetorial de *Lu. gomezi*, e se existe correlação com os números de casos da leishmaniose cutânea nas regiões de maior incidência. Esses dados poderão ser utilizados no planejamento de políticas de controle do vetor.

## **Agradecimentos**

À Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología Innovadora (SENACYT), Instituto Comemorativo Gorgas (ICGES) e Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), pelo apoio logístico nas coletas de flebotomíneos no Panamá. À Maykon Cristiano Passos, pelo auxílio laboratorial e nas análises dos dados.

## Referências

Alexander JB, Young DG (1992) Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 397-403.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL (2007) *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 481-487.

Añez N, Cazorla D, Nieves E, Chataing B, Castro M, et al. (1988) Epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria en Mérida, Venezuela. I. Diversidad y dispersión de especies flebotomínicas en tres pisos altitudinales y su posible rol en la transmisión de la enfermedad. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 455-463.

Arrivillaga J, Rangel Y, Oviedo M, Feliciangeli MD (2000) Genetic divergence among Venezuelan populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J Med Entomol 37: 325-330.

Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, et al. (2008) Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American cutaneous leishmaniasis in state of Acre, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 760-767.

Azpurua J, de la Cruz D, Valderrama A, Windsor D (2010) *Lutzomyia* sandfly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. Plos Negl Trop Dis 4: e627.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16: 37-48.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID (2002) Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 645-647.

Black IV WC, Tabachnick WJ (2004) Population genetics in vector biology. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The Biology of Disease Vectors. Niwot: University Press of Colorado. pp. 417-437.

Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID (2009) Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. Rev Soc Entomol Argent 68: 135-141.

Bush MB, DR Piperno, PA Colinvaux, PE, De Olivera LA, Krissek MC et al. (1992) A 14,300 yr paleoecological profile of a lowland tropical lake in Panama. Ecol Monogr 62: 251-275.

Calcagnotto D (2001) Taxa de evolução e o relógio molecular. In: Matioli SR, editor. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto SP: Holos Editora. pp. 52-63.

Coates AG, Obando JA (1996) Geological evolution of the Central American Isthmus. In Jackson JBC, Budd AF, Coates AG editors. Evolution and environment in tropical America. Chicago: University of Chicago Press. pp. 21-56.

Cortés LA, Fernández JJ (2008) Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. Biomédica 28: 433-440.

Cox CB (2000) Plate tectonics, seaways and climate in the historical biogeography of mammals. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 509-16.

Chanotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM (1971) Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotominae sandflies in Panama. J Med Entomol 8: 415-420.

Christensen HA, Herrer A, Telford SR (1972) Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. II. Entomological investigations. Ann Trop Med Parasitol 66: 55-66.

Christensen H, Fairchild GB, Herrer A, Johnson C, Young D, de Vásquez A (1983) The ecology of cutaneous, leishmaniasis in the Republic of Panama. J Med Entomol 20: 463-484.

Christensen H, Johnson C, Vasquez AM (1984) Leishmaniasis cutánea en Panamá: un breve resumen. Rev Med Panama 9: 182-1987.

Duque P, Vélez ID, Morales M, Sierra D (2004) Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian communities of Choco, Pacific Coast of Colombia. Neotrop Entomol 33: 255-264.

ETESA . Available:<http://www.etsa.com.pa/>. Accessed 2011 nov 1.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider, S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 1: 47-50.

Feliciangeli MD, Rabinovich J (1988) Abundance of *Lutzomyia ovallesi* but not *Lu. gomezi* (Diptera: Psychodidae) correlated with cutaneous leishmaniasis incidence in north-central Venezuela. Med Vet Entomol 12: 121-131.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925.

Grimm E, Lozano-García S, Behling H, Markgraf V (2001) Holocene vegetation and climate variability in the Americas. in: Markgraf, V, editor. Interemispheric Climate Linkages. San Diego. pp. 325-370.

Gomes LHM, Nery LCR, Pinheiro FG, Freitas RA, Franco AMR (2009) Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em terra firme e planície fluvial na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Amazonas, Brasil. Acta Amaz 39: 223-226.

- Hamarshah O, Presber W, Abdeen Z, Sawalha S, Al-Lahem A, Schoenian G (2007) Genetic structure of mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Med Vet Entomol* 21: 270-277.
- Heckadon M S (2001) Panamá: Puente biológico. Panama. Panamá: Smithsonian Tropical Research Institute. pp. 233.
- Hoernle K, Bogaard PVD, Werner R, Lissinna B, Hauff G, et al. (2002) Missing history (16-71 Ma) of the Galapagos hotspot: Implications for the tectonic and biological evolution of the Americas. *Geology* 30: 795-798.
- Huelsenbeck JP, Ronquist, F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics tree. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jiménez AE, Rojas JC, Vargas F, Herrero MV (2000) Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. *J Med Entomol* 37: 216-221.
- Jaramillo C, Travi BL, Montoya J (1994) Vector competence of some neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. *Med Vet Entomol* 8:1-7.
- Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M (2005) Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 43-46.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Linares OF, Sheets PD, Rosenthal EJ (1975) Prehistoric agriculture in tropical highlands. *Science* 187: 137-145.
- Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Fillipis AMB, Failloux A (2004) *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 98: 43-54.
- Márquez LM, Lampo M, Rinaldi M, Lau P (2001) Gene flow natural and domestic populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of American visceral leishmaniasis in Venezuela. *J Med Entomol* 38: 12-16.
- Martins AV, Williams P, Falcão AL (1978) American sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rio de Janeiro: Acad Bras Ciênc. pp. 195.
- Miller MP (2005). Alleles in space (AIS): computer software for the joint analyses of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96: 722-724.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES (2002) Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Plebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44: 255-259.

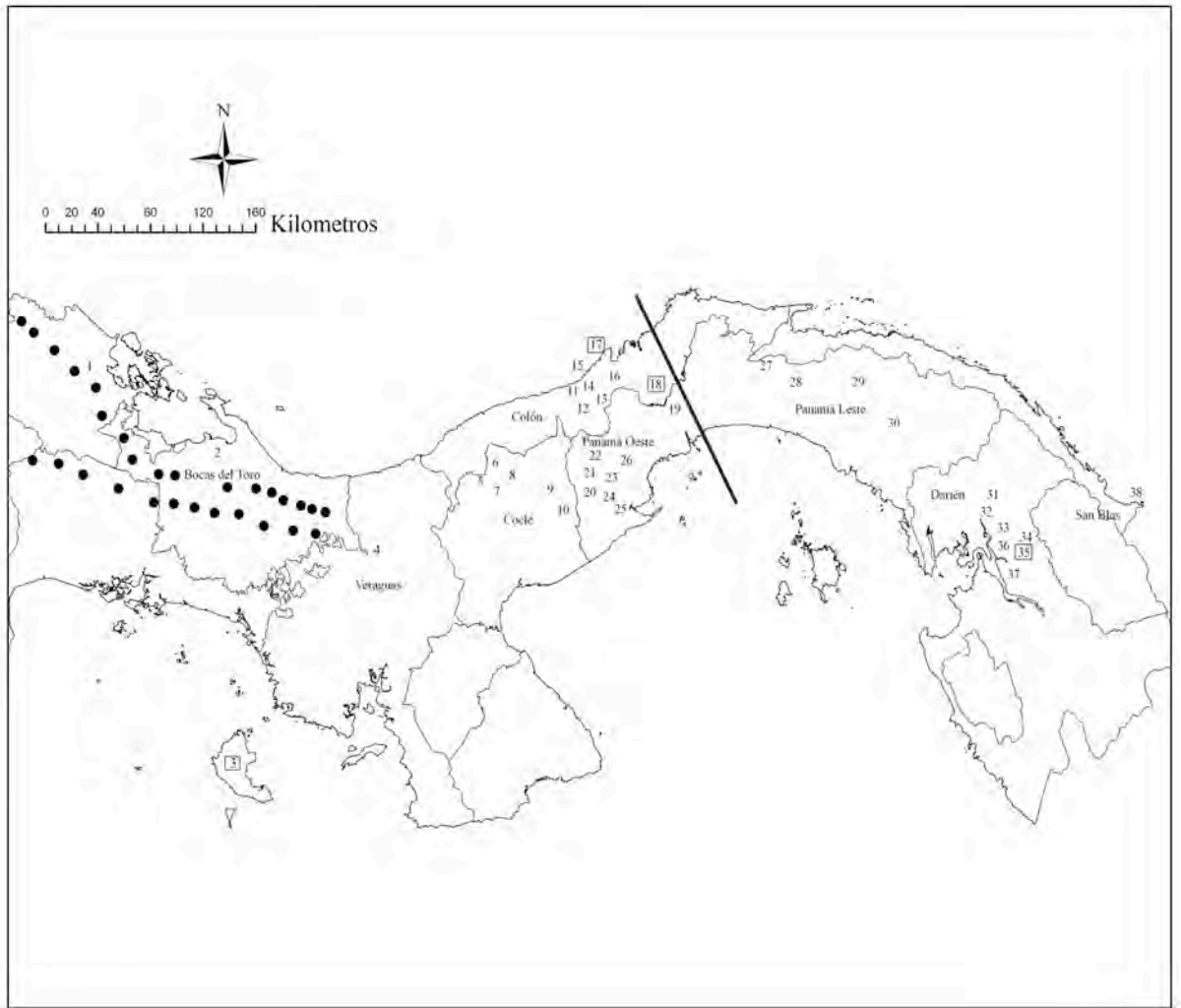
- Molina-Cruz A, De Mérida AMP, Mills K, Rodríguez F, Schoua C, et al. (2004) Gene Flow Among *Anopheles albimanus* populations in Central América, South América and the Caribbean Assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. *Am J Trop Med Hyg* 71: 350-359.
- Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML (1993) Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 30: 427-35.
- Nahum LA (2001) Evolução dos genomas. In: Matioli SR, editor. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto SP: Holos Editora. pp. 82-96.
- Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *System Biol* 53: 47-67.
- Parvizi P, Assmar M (2007) Nuclear elongation factor 1- $\alpha$  gene, A molecular marker for Iranian sandfly identification. *Iranian J Publ Health* 36: 25-37.
- Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA (2010) Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Med Vet Entomol* 24: 150-161.
- Peñalver E, Grimaldi D (2005) Assemblages of mammalian hair and blood-feeding midges (Insecta: Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Miocene amber. *Trans R Soc Edin: Earth Sci* 96: 177-195.
- Piperno, DR, Bush MB, Colinvaux PA (1990) Paleoenvironments and human occupation in late-glacial Panama. *Quaternary Res* 33: 108-116.
- Piperno DR Jones J (2003) Paleoeological and archaeological implications of a late pleistocene/early holocene record of vegetation and climate from the Pacific coastal plain of Panama. *Quaternary Res* 59:79-87.
- Ready PD, Day JC, de Souza AA, Rangel EF, Davies CR (1997) Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peridomestic and silvatic transmission of *Leishmania* species. *Bull Entomol Res* 87: 187-195.
- Ready PD, de Souza AA, Macario Rebelo JM, Day JC, Silveira FT, et al. (1998) Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the southeast boundary of Amazonian Brazil. *Transact R Soc Trop Med Hyg* 92: 159-160.
- Reisen WK, Lothrop HD, Presser SB, Hardy JL, Gordon EW (1997) Landscape ecology of arboviruses in southeastern California: temporal and spatial patterns of enzootic activity in Imperial Valley, 1991-94. *J Med Entomol* 34: 179-188.
- Salomón OD, Quintana MG, Flores I, Andina AM, Molina S, et al. (2006) Phlebotominae sand flies associated with a tegumentary leishmaniosis outbreak, Tucuman Province, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 341-346.
- Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C (2006) Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el

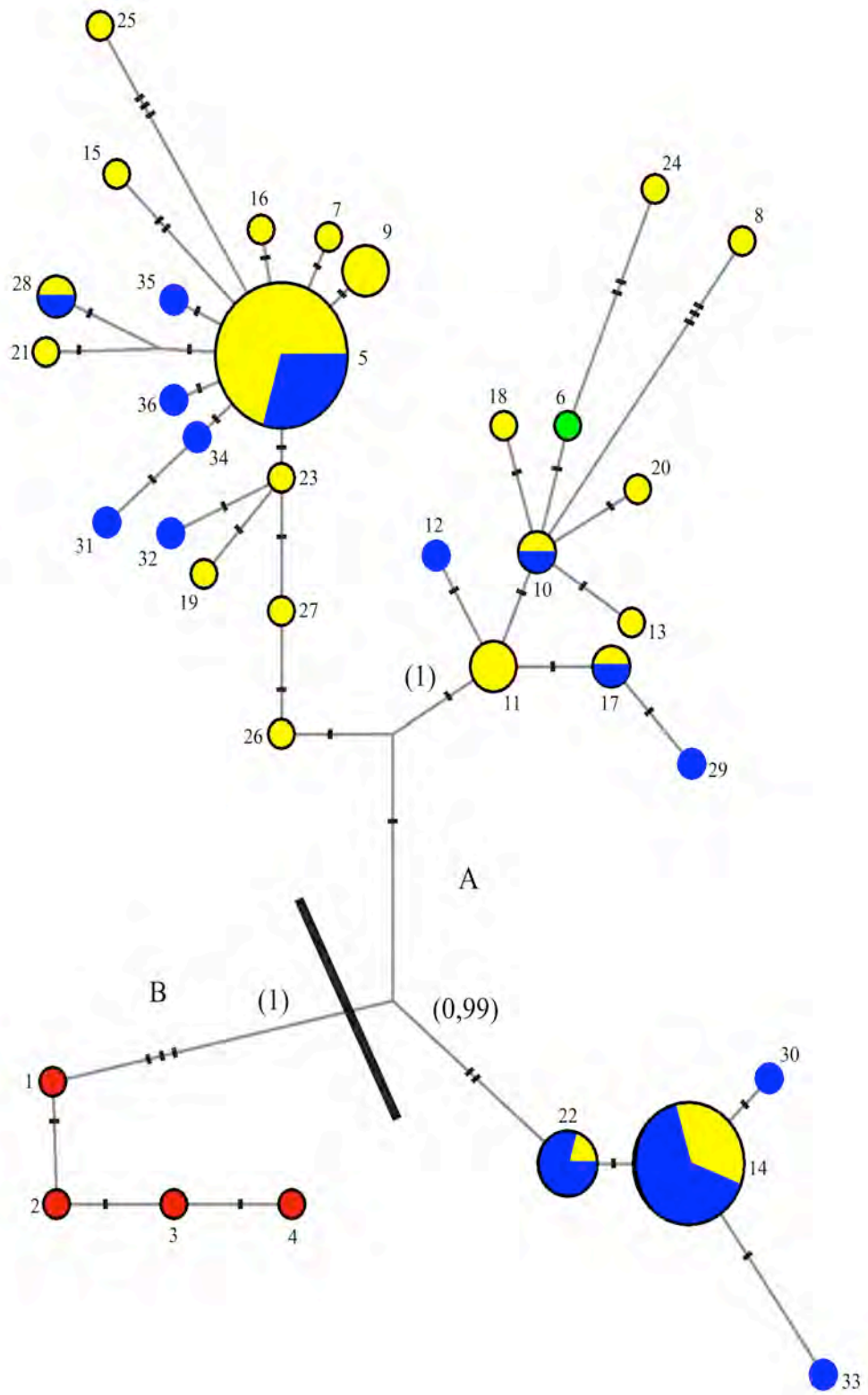
- occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica* 26: 82-94.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-701.
- Sudia WD, Chamberlain RW (1962) Battery operated light trap, an improved model. *Mosq News* 22: 126-129.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Testa JM, Montoya-Lerna J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD (2002) Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop* 84: 205-218.
- Ticher A, Graur D (1989) Nucleic acid composition, codon usage, and the rate of synonymous substitution in protein-coding genes. *J Mol Evol* 28: 286-298.
- Travi BL, Alder GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J (2002) Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forest in northern Colombia. *J Med Entomol* 39: 451-456.
- Valderrama A, Tavares MG, Andrade Filho DJ (2011) Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 1024-1031.
- Virgens TM, Santos CB, Pinto IS, Silva KS, Leal FC, Falqueto A (2008) Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil. *Cad Saude Publ* 24: 2969-2978.
- Vivero RJ, Contreras-Gutiérrez MA, Bejarano EE (2007) Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. *Biomédica* 27: 429-438.
- Vivero RJ, Contreras MA, Cadena H, Acosta LA, Mondragon K, et al. (2011) Sand flies Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in five Central American countries. International Symposium on Phlebotominae Sandflies ISOPS VII, April 25-30, Turkey. Abstract O-081.
- Webb SD (2006) The great American biotic interchange: patterns and processes. *Ann Mo Bot Gard* 93: 245-257.
- Weir BS, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

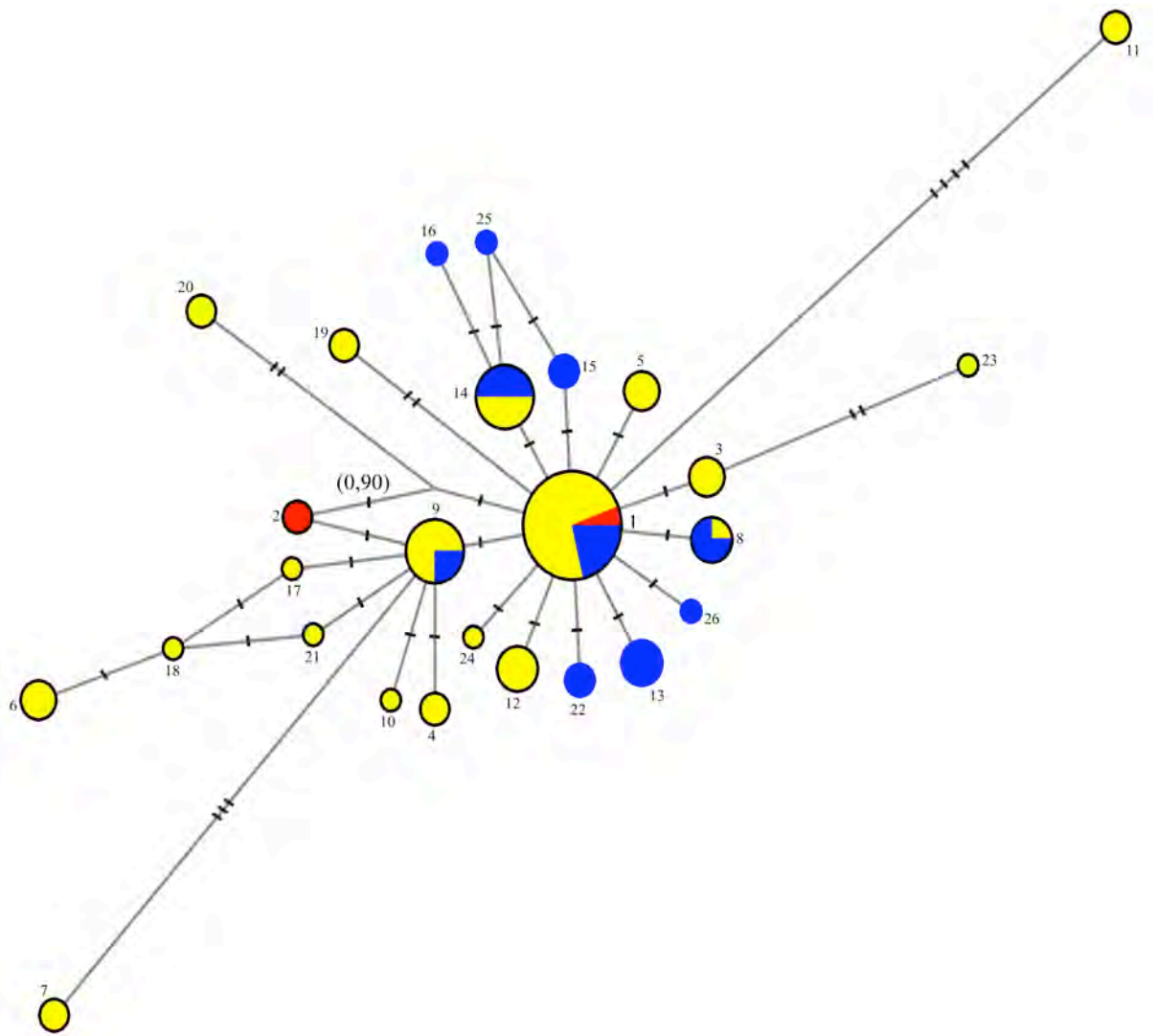
Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Ent Inst 54: 1-881.

## Legendas das Figuras

- Figura 1. Localização geográfica dos locais de coleta de *Lutzomyia gomezi*. As linhas pontilhadas (•) indicam os limites da Cordilheira Central e, a linha contínua (—) indica o Canal do Panamá. Os números dentro dos quadrados representam as quatro reservas naturais (florestas) protegidas pela Autoridade Nacional do Ambiente (ANAM), utilizadas como controle.
- Figura 2. Rede de haplótipos construída com base em 86 sequências mitocondriais de *Lutzomyia gomezi*. Os círculos representam os diferentes haplótipos e são proporcionais às frequências haplotípicas. Os traços entre os haplótipos indicam o número de mutações. Cada cor, nos círculos representa uma das quatro populações: Oeste (vermelho), Central (amarelo), Leste (preto) e Ilha Coíba (verde). A linha perpendicular representa o limite entre os clados A e B. Os valores entre parênteses representam a probabilidade *a posteriori* da inferência Bayesiana.
- Figura 3. Rede de haplótipos construída com base em 166 sequências nucleares de *Lutzomyia gomezi*. Os círculos representam os diferentes haplótipos e são proporcionais às frequências haplotípicas. Os traços entre os haplótipos indicam o número de mutações. Os valores entre parênteses representam a probabilidade *a posteriori* da inferência Bayesiana e, as cores utilizadas para representar as populações são as mesmas da Figura 2.







## Tabelas

**Tabela 1.** Locais de coleta das populações de *Lutzomyia gomezi*, com informações sobre as características paisagísticas e os haplótipos mitocondriais e nucleares identificados em cada localidade

Populações	Locais	N	Macro ambiente	Micro ambiente	Haplótipo mitocondrial	Haplótipo nuclear	
Panamá Oeste	1-Nance Valle Risco	2	Fr	Peridomicilio	1-2	1-2	
	2-Bisira	2	R	Peridomicilio	3-4	1	
Ilha Coiba	3-Parque Nacional Coiba	1	Fo	Floresta	6	4	
	4-Altos de Piedra	2	Fr	Peridomicilio	5	1-3	
	5-Villa del Carmen	1	R	Peridomicilio	7	1	
	6-Coclesito	2	R	Peridomicilio	9-10	1	
	7-Molejón	3	Fr	Peridomicilio	8-9-5	1-12	
	8-Cutevilla	3	Fr	Peridomicilio	5-10-11	1-24	
	9-Vaquilla	3	Fr	Peridomicilio	5-11	1-23	
	10-Chirigui Arriba	2	R	Peridomicilio	12-13	3-22	
	11-Quebrada Leona	3	Fr	Peridomicilio	14-15-16	1-17-18-19	
	Panamá Central	12-Cuipo	4	R	Peridomicilio	5-14-21-22	1-6-9-20-21
		13-Providencia	3	R	Peridomicilio	9-14-20	1-9
14-Achiote		3	R	Peridomicilio	11-18-19	1	
15-Piña		2	Fr	Peridomicilio	5-17	1	
16-Unión Piña		2	Fr	Peridomicilio	5-14	1	
17-Parque Nacional San Lorenzo		1	Fo	Floresta	5	1	
18-Parque Nacional Camino del Oleoducto		1	Fo	Floresta	14	1	
19-Altos de Divisa		1	R	Peridomicilio	5	1	
20-Cacao		3	Fr	Peridomicilio	5-27	1-5	
21-Trinidad		1	Fr	Peridomicilio	28	1	
22-Vista Alegre		3	Fr	Peridomicilio	14-22	1-11	
23-Valdeza		2	R	Peridomicilio	5-26	1-9-10	
24-Caimito		2	R	Peridomicilio	22-28	6	
25-Limón		3	Fr	Peridomicilio	23-24-25	1-7-8	
26-Ollas Arriba		3	R	Peridomicilio	5	1-9-12	
Panamá Leste		27-Madroño	1	Fr	Peridomicilio	5	14
	28-Gato Real	3	Fr	Peridomicilio	14-17-29	1-14-15-16	
	29-Buenos Aires (Chepo)	3	Fr	Peridomicilio	5-14	1	
	30-Torti	3	Fr	Peridomicilio	5-14-30	1-13-14	
	31-Arimay	1	R	Peridomicilio	14	1	
	32-La Cantera	3	R	Peridomicilio	14-31	1-13-14	
	33-Nicanor	3	Fr	Peridomicilio	5-32-33	1-13	
	34-Buenos Aires (Darién)	3	R	Peridomicilio	5-14	1-8-9	
	35-Parque Serranía Filo del Tallo	1	Fo	Floresta	5	1	
	36-Bijagual	3	Fr	Peridomicilio	14-22-34	1-13	
	37-Rio Iglesia	3	R	Peridomicilio	14-35-36	8-14-25-26	
38-Puerto Obaldía	1	Fr	Peridomicilio	14	1		

N: Tamanho amostral; Fr: ambiente fragmentado; R: ambiente rural; Fo: floresta

**Tabela 2.** Estimativas dos parâmetros de diversidade genética obtida com os genes mitocondrial e nuclear para as populações de *Lutzomyia gomezi*

Gene mitocondrial	Panamá Oeste	Panamá Central	Panamá Leste
Nº haplótipo	4	23	12
h(d)±SE	1,0 ±0,18	0,89±0,04	0,80±0,061
π(d)±SE	0,005 ±0,004	0,010±0,006	0,013±0,007
Tajima D	0,17	-1,08	0,42
Fs-Fu	-1,7	-9,41	-0,85
Gene nuclear	Panamá Oeste	Panamá Central	Panamá Leste
Nº haplótipo	2	18	9
h(d)±SE	0,43±0,17	0,58±0,06	0,62±0,07
π(d)±SE	0,002±0,002	0,004±0,003	0,003±0,002
Tajima D	0,45	-1,91	-1,42
Fs-Fu	2,47	-5,47	-1,87

h: Diversidade haplotípica; π: diversidade nucleotídica; SE: desvio padrão. Significância  $p < 0.01$  para Tajima e  $p < 0.02$  para Fs-Fu.

**Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA) para o gene mitocondrial e nuclear, considerando-se todas as populações de *Lutzomyia gomezi* analisadas

Tipo	Gene mitocondrial			Gene nuclear		
	Varição	gl	Índice de Fixação	Varição	gl	Índice de Fixação
Entre populações	3	22,6	$\Phi_{ST} = 0,22^*$	3	9,2	$\Phi_{ST} = 0,10^*$
Dentro das populações	82	77,4		162	90,8	

gl = graus de liberdade; \*  $P < 0.01$

**Tabela 4.** Diferenciação genética  $F_{ST}$  (acima da diagonal) e taxa de migração (abaixo da diagonal) das populações de *Lutzomyia gomezi*, inferidas pelos genes mitocondrial e nuclear

Populações			
gene mitocondrial	Panamá Oeste	Panamá Central	Panamá Leste
Panamá Oeste		0,57*	0,47*
Panamá Central	1,38		0,11*
Panamá Leste	0,57	4,11	
gene nuclear	Panamá Oeste	Panamá Central	Panamá Leste
Panamá Oeste		-0,02	0,08
Panamá Central	inf		0,04*
Panamá Leste	5,88	11,36	

\*  $P < 0,01$

**Comparação da diversidade genética e estruturação geográfica das populações silvestres e peridomiciliares de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

## Resumo

O principal vetor da leishmaniose visceral, *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), tem sido amplamente estudado pela discordância taxonômica de ser ou não um complexo de espécies crípticas e pelas implicações epidemiológicas deste por trás disso. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética e a filogeografia de populações naturais de *Lu. longipalpis* no Panamá, de modo a compreender a importância dessas populações e o impacto das mesmas na epidemiologia da doença. Sequências de DNA mitocondrial e nuclear concatenadas do gene citocromo B/início do NADH1 e do gene do fator de alongação nuclear alfa-1 (EF- $\alpha$ 1) de 6 indivíduos de *Lu. longipalpis* provenientes da Ilha Boná e 6 da comunidade de Limón foram analisadas. Dos 11 haplótipos obtidos a partir das sequências concatenadas, sete estavam presentes exclusivamente na localidade de Limón e três exclusivamente na Ilha Boná. Um único haplótipo foi compartilhado entre as duas localidades. As diversidades haplotípica e nucleotídica foram  $h=0,70$  e  $\pi=0,0015$  para a população de Boná e  $h=0,95$  e  $\pi=0,003$ , para a de Limón. As análises de diferenciação genética entre as duas populações demonstraram diferenças significativas ( $F_{st}=0,17$ ;  $p<0,05$ ) entre as mesmas. Também se obteve diferenças significativas ( $p<0,05$ ) quando se comparou as sequências do Panamá com outras obtidas no Genbank, para o gene citocromo B/início do NADH1 de populações de *Lu. longipalpis* da Colômbia ( $F_{st}=0,98$ ), Costa Rica ( $F_{st}=0,98$ ) e Brasil ( $F_{st}=0,72$ ). A existência de haplótipos únicos em cada local e a diferenciação genética significativa registrada sugere que as populações de *Lu. longipalpis* no Panamá estão em processo de especiação devido ao isolamento das duas populações pelo Oceano Pacífico e pelos eventos que caracterizaram o surgimento do istmo de Panamá.

**Palavras chaves:** Leishmaniose visceral, variabilidade genética, filogeografia, dispersão, vicariância

## Introdução

A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) (Diptera: Phlebotominae) tem sido amplamente estudada devido à sua importância médica como principal transmissor da *Leishmania infantum chagasi*, causadora da leishmaniose visceral americana (Lainson & Shaw 1998, Rangel & Lainson 2003).

A distribuição de *Lu. longipalpis*, uma espécie considerada silvestre, vai desde o México até a Argentina, coincidindo com os locais de registro da doença (Young & Duncan 1994). Entretanto, a destruição dos habitats naturais dos flebotomíneos tem facilitado a migração de indivíduos ao peridomicílio. Esse fato tem modificado a epidemiologia da doença, de transmissão silvestre para domiciliar (Service 1991, Walsh et al. 1993, Quinnell & Dye 1994).

Diferenças morfológicas observadas por Mangabeira (1969) em espécimes de *Lu. longipalpis* oriundos dos estados do Pará e Ceará sugeriram a hipótese da existência de um complexo de espécies crípticas no Brasil. Posteriormente, estudos de entrecruzamento, feromônios e som de corte demonstraram o isolamento reprodutivo dessas populações de *Lu. longipalpis* (Ward et al. 1983, 1985, Hamilton et al. 1996, Bauzer et al. 2002, Souza et al. 2002, 2004, Maingon et al. 2003). Adicionalmente, estudos de entrecruzamento e análises isoenzimáticas evidenciaram o isolamento reprodutivo de populações de *Lu. longipalpis* da Costa Rica, Colômbia e Brasil (Lanzaro et al. 1993, Mutebi et al. 2002). Análises com marcadores mitocondriais ND4 e COI também demonstraram diferenças genéticas entre populações de *Lu. longipalpis* presentes na América Central e do Sul, sugerindo a existência de quatro complexos de espécies crípticas: populações brasileiras, andinas trans, andinas cis e as populações de Laran, na Venezuela (Soto et al. 2001, Arrivillaga et al. 2002).

Por outro lado, marcadores moleculares como citocromo b, isozimas e RAPD, não evidenciaram diferenças genéticas capazes de comprovar a existência de espécies crípticas nas populações distribuídas no Brasil (Hodgkinson et al. 2003, Balbino et al. 2006). Portanto, verifica-se que ainda não existe um consenso sobre a situação taxonômica de *Lu. longipalpis*.

Independente da existência ou não de um complexo de espécies crípticas, *Lu. longipalpis* tem grande importância na epidemiologia da leishmaniose visceral americana. Estudos comparativos da saliva das populações de *Lu. longipalpis* do centro-sul da América mostraram que a composição de aminoácidos da proteína maxadilan diferencia-se, influenciando na visceralização de *Leishmania* (Warburg et al. 1994,

Lanzaro et al. 1999). Os sintomas clínicos da leishmaniose transmitida pelos indivíduos de *Lu. longipalpis* presentes no Brasil e na Colômbia desenvolvem-se em lesões viscerais, enquanto que a transmissão pelos indivíduos presentes na Costa Rica induzem sintomas de leishmanioses tegumentar, com lesões não ulcerativas (Zeledon et al. 1989, Warburg et al. 1994). Sendo assim, é possível que as diferenças entre as espécies do complexo *Lu. longipalpis* influenciem na capacidade vetorial e controle da doença.

Inicialmente, a maioria dos estudos realizados sobre flebotomíneos, no Panamá, focou nas espécies vetores de leishmaniose cutânea (Christensen et al. 1972, 1983, Herrer et al. 1973, ). Porém, coletas recentes, atualizando as informações ecológicas dessas espécies, reportaram a presença de indivíduos de *Lu. longipalpis* em áreas peridomiciliares, em uma região endêmica de leishmaniose cutânea no Panamá (Valderrama et al. 2011). Esse dado indica a necessidade de se monitorar constante e sistematicamente as diversas espécies vetores nas regiões com alta incidência da leishmaniose, como medida de prevenção e alerta precoce.

Atualmente, entretanto, pouco se sabe sobre a distribuição, ocorrência e implicação dessa espécie na transmissão da leishmaniose no País. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estimar e comparar a variabilidade genética intra e interpopulacional das populações silvestres e peridomiciliares de *Lu. longipalpis*, obtidas em uma região com alta incidência de leishmaniose cutânea no Panamá. Adicionalmente, as sequências do citocromo b obtidas neste estudo foram comparadas com aquelas de populações coletadas na Costa Rica, Colômbia e Brasil e disponíveis no acesso público do Genbank NCBI, a fim de confrontar os haplótipos existentes nesses países da América Central e do Sul.

## **Material e métodos**

Amostras de *Lutzomyia. longipalpis* foram obtidas em duas localidades do Panamá (Ilha Boná e Limón).

As amostras da Ilha Boná, município de Otoque, foram coletadas entre agosto de 2009 e maio de 2010. Essa ilha inabitada localiza-se entre as coordenadas 8° 34'24''N - 79° 35'24'' e, segundo a classificação climática de Köppen, possui clima tropical, influenciado pela massa de ar do oceano Pacífico. A vegetação predominante é a floresta úmida primária, sem intervenção antropogênica. As temperaturas médias podem chegar a mais de 27°C e a umidade do ar a 90%. Para a coleta dos adultos as armadilhas de luz (Sudia e Chamberlain 1962) foram colocadas dentro da floresta, próximas a

ninhos de animais, fendas de pedras, buracos no solo e ocos de árvores.

As amostras da comunidade rural de Limón, distrito de Capira, localizada entre as coordenadas 8° 41'14"N - 79° 54'3"O, foram obtidas entre junho/agosto de 2010. A classificação climática da região é savana tropical, com temperatura média de 23°C e umidade do ar de 80%. A cobertura vegetal é heterogênea entre remanescentes de floresta secundária e gramíneas. As armadilhas de luz foram colocadas no peridomicílio das casas, próximas a abrigos de animais domésticos e vegetação arbustiva.

As armadilhas foram colocadas a 1.5 m de altura, com uma distância de 50 metros uma da outra. O período de captura foi de 12 horas (18 às 6 horas), durante três dias consecutivos, em cada local. Os espécimes foram mortos com clorofórmio, preservados em álcool 95% e armazenados a -20°C. Os mesmos foram identificados segundo os critérios taxonômicos de Young e Duncan (1994).

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo de Michalsky et al. (2002), com algumas modificações. Cada indivíduo foi homogeneizado em tampão de lise (100 mM TRIS-HCl, 100 Mm NaCl, 25 Mm EDTA, 0,5% SDS, pH 8.0) e enzima protease 20 mg/ml e incubado a 37°C *overnight*. O DNA foi purificado com fenol:clorofórmio:isoamílico (26:25:1), seguido da precipitação do pellet com acetato de sódio 3M, pH 5,2 e etanol absoluto frio e final etanol 70%. O DNA genômico foi ressuspensionado em 20 µl de TE (10 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 1Mm EDTA pH 8,0) e armazenado a -20°C até seu uso.

Os primers empregados para a amplificação dos 501 nt do mtDNA (294 nt final do Cytb, 4 nt da região intergênica IGS-1, 68 nt de tRNA-Ser, 16 nt da região intergênica IGS-2 e 119 nt do início do gene da NADH1) foram: CB3-PDR 5'-CA(T/A)ATTCAACC(A/T)GAATGATA-3' e NIN-PDR 5'-GGTA(C/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA-3' (Ready et al. 1997). Para uma reação de PCR (25 µl) foram utilizados 50 ng de DNA genômico, tampão (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, primers (10pM) e 1U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Ready et al. (1997). O produto de amplificação foi separado em um gel de agarose a 1,5.

Para a análise do fragmento de 662 nt do gene do fator de alongação nuclear alfa-1 (EF-α1) foram utilizados os primers EF-F03 5'GCTCCTGGACATCGTGA(T/A)TT-3' e EF-R04 5'AGTGCTTCGTGGTTGTAT(C/T)TC-3' (Testa et al. 2002). As condições de amplificação foram detalhadas em Parvasi & Assmar (2007). Para uma reação de 25 µl de volume final, foram utilizados 50 ng de DNA genômico, tampão (1X), MgCl<sub>2</sub>

(1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, primers (10mM) e 1,25U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega).

Um controle negativo, sem DNA molde, foi incluído em cada reação de PCR. Os produtos das amplificações foram sequenciados diretamente pela Macrogen Inc (Coréia do Sur), utilizando os mesmos primers das amplificações. As sequências foram comparadas com a ferramenta BLAST disponível no GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) para verificar a similaridade entre as sequências de *Lu. longipalpis* armazenadas na base de dados.

As sequências nucleotídicas foram editadas utilizando-se o software CodonCode Aligner e alinhadas com a opção Muscle do software MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011). Para o gene mitocondrial, as regiões IGS1 e 2 e o gene do tRNA-Ser foram excluídas das análises, sendo mantidas apenas as sequências do Cytb e do gene da NADH1, por serem mais informativas. Subsequentemente, os genes mitocôndrias e o nuclear foram concatenados manualmente no software Mega 5.05.

Para a reconstrução dos haplótipos, com as sequências concatenadas, e determinação dos locos heterozigotos, utilizou-se o modelo de recombinação na opção PHASE, incorporado no software DnaSP 5 (Librado & Rozas 2009). Para calcular o número de haplótipos, a diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) de cada população, utilizou-se os softwares DnaSP 5 (Librado & Rozas 2009) e Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1983) e  $F_s$ - $F_u$  (Fu 1997) foram utilizados para verificar a ocorrência de expansão populacional em cada local. Em ambos os testes foram empregadas permutações de 1000 vezes, procedimento estabelecido no software Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005).

As 12 sequências de *Lu. longipalpis* do Panamá, obtidas no presente estudo, foram comparadas com uma sequência de *Lu. longipalpis* coletada na Gruta da Lapinha/Minas Gerais/Brasil (também sequenciada no presente trabalho), três sequências da Colômbia, duas da Costa Rica e duas do Brasil, disponíveis no GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information; AF403492.1-AF403498.1).

A comparação par a par para determinar diferenças genéticas entre as amostras foi calculada com o software Arlequin 3.11 e permutações não paramétricas de 10 000 vezes ( $p=0,05$ ).

Foram construídas duas redes de haplótipos, uma considerando-se apenas as amostras provenientes do Panamá e outra com todas as 20 sequências. Estas redes foram inferidas mediante o método Median Joining Network (Bandelt et al. 1999) utilizando o software Network de Fluxus Techology Ltd. Para obter os valores das

probabilidades *a posteriori* entre os clados, a análise Bayesiana foi realizada utilizando o software MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist 2001). O software MrModelTest (Nylander et al. 2004) foi utilizado para determinar o modelo de substituição nucleotídica, segundo o critério AIC (Akaike Information Criterion). Para a análise foram utilizados 10 milhões de gerações para cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) e burn-in de 5 milhões.

Os tempos de divergência entre as diferentes populações de *Lu. longipalpis* (Costa Rica, Panamá, Colômbia e Brasil) foram calculados mediante o relógio molecular escrito com o software Beast v1.7.0. A taxa de mutação empregada para gerar o tempo foi de 2.3% cada milhão de ano (Coutinho-Abreu et al. 2008). O modelo de substituição utilizado foi HKY, segundo o critério AIC (Akaike Information Criterion) gerado por o software MrModelTest. Para a análise foram utilizados 10 milhões de gerações para cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) e burn-in de 400 milhões.

## Resultados

Foram capturados um total de 28 indivíduos de *Lu. longipalpis*, 12 na floresta da Ilha de Boná (sete fêmeas/cinco machos) e 16 no peridomicílio das casas da comunidade de Limón (nove fêmeas/sete machos). Os machos coletados apresentaram uma mancha branca no IV tergito abdominal, como observado por Mangabeira (1969) e Ward et al. (1983, 1985) para as populações brasileiras.

A caracterização das sequências concatenadas dos 12 indivíduos coletados no Panamá (6 na Ilha Boná e 6 em Limón), sendo 5 machos e 7 fêmeas, evidenciou um fragmento composto por 1046 nucleotídeos, assim constituído: 1035 sítios conservados e 11 sítios polimórficos, dos quais quatro sítios foram parcimoniosos (filogeneticamente informativos) e sete singletons. A diversidade haplotípica foi de  $0,70 \pm 0,22$  em Boná e  $0,95 \pm 0,09$  em Limón, enquanto a nucleotídica foi de  $0,0015 \pm 0,0011$  em Boná e  $0,003 \pm 0,0021$  em Limón.

Dos 11 haplótipos obtidos a partir das sequências concatenadas, sete estavam presentes exclusivamente na localidade de Limón e três exclusivamente na Ilha Boná. Um único haplótipo foi compartilhado entre as duas localidades (Fig.1a). A rede de haplótipos (Fig. 1b) sugere que o haplótipo (H2), presente na população da Ilha Boná, pode ser o haplótipo ancestral e que os demais haplótipos derivaram dele a partir de um ou dois passos mutacionais.

Os valores dos testes de neutralidade Tajima ( $-0,19 \pm 0,46$ ) e Fu-Fs ( $-2,67 \pm 0,10$ ) foram não significativos, sugerindo a ausência de expansão populacional.

Comparando-se as sequências mitocondriais obtidas no presente trabalho com as do cyt b/NADH1 do GenBank obteve-se 14 haplótipos: seis no Panamá, dois na Costa Rica, três na Colômbia e três no Brasil. Diferentes haplótipos foram detectados em cada um dos países comparados, evidenciando a presença de quatro linhagens distintas, uma em cada um deles (Figura 2).

A diferenciação genética entre as populações da Ilha Boná e Limón foi alta ( $F_{st}=0,17$ ;  $P<0,05$ ), porém, bem menor do que a detectada entre a população do Panamá e as demais populações comparadas: Panamá-Colômbia ( $F_{st}=0,98$ ), Panamá-Costa Rica ( $F_{st}=0,98$ ), Panamá-Brasil ( $F_{st}=0,72$ ). O tempo de divergência entre Panamá-Colômbia foi estimado em aproximadamente 1,501 Mya, Panamá-Costa Rica foi 1,355 Mya e Panamá-Brasil 1,131 Mya.

## Discussão

*Lutzomyia longipalpis* é uma espécie inconspícua no Panamá, de distribuição restrita e pouco abundante. Anteriormente esta espécie havia sido encontrada apenas no Parque Nacional Altos de Campana e na Ilha Boná, em ambientes florestais (Theodor 1965, Young & Duncan 1994, Garcés et al. 1999, Valderrama et al. 2008). Recentemente, porém, machos e fêmeas dessa espécie foram detectados no peridomicílio da comunidade de Limón (Valderrama et al. 2011). Esse achado sugere que essa espécie pode ter se adaptado ao domicílio/peridomicílio, próximo a ambientes florestais, podendo, nesse caso, atuar como vetor de leishmaniose nessas regiões.

Os machos de *Lu. longipalpis* coletados nas localidades amostradas nesse estudo apresentavam uma única mancha branca no IV tergito abdominal, indicando que esta pode ser a forma morfológica estabelecida no Panamá. Até agora tem sido documentado que os indivíduos com uma mancha têm ampla distribuição, desde o México até o sul do Brasil (Ward et al. 1983), e que indivíduos com duas manchas abdominais têm uma distribuição restrita no nordeste de Brasil, possuindo maior importância na transmissão da doença (Ward et al. 1983, 1985).

Nossos dados evidenciaram que, nos dias atuais, as duas populações de *Lu. longipalpis* do Panamá poderiam estar em processo de separação ( $F_{st}=0,17$ ), pois todos os haplótipos detectados, com exceção do H3, estavam presentes exclusivamente em uma ou em outra população. Estas duas populações estão separadas por uma distância

de 37 km, pelo oceano Pacífico e, essa barreira geográfica é suficiente para isolar as mesmas. Dessa forma, qualquer intercâmbio entre elas, deve ocorrer, obrigatoriamente, com a dispersão dos indivíduos por ar ou mar, o que parece improvável, devido à baixa capacidade de vôo dessa espécie (Morrison et al. 1993).

Apesar dos indivíduos de *Lu. longipalpis* no Panamá estarem sendo influenciados, principalmente, pelas barreiras geográficas, as condições climáticas também podem estar contribuindo para essa diferenciação. O regime de salinidade influenciado pelo mar e as temperaturas acima de 27°C são condições às quais as populações de Ilha Boná tiveram que adaptar-se, em uma reduzida área de deslocamento de 110 hectares. Por outro lado, a população de Limón desenvolveu-se em condições climáticas características de savana tropical e vegetação de floresta úmida, ainda que com a forte influência antropogênica na região.

Adicionalmente, considerando-se que *Lu. longipalpis* foi registrada unicamente nas localidades de Limón e Ilha Boná (Valderrama et al. 2011), sugere-se que variações climáticas características do istmo do Panamá possam restringir a distribuição geográfica dessa espécie. Entretanto, consideramos que uma amostragem mais intensiva e anual poderia trazer mais informações sobre a sua distribuição geográfica.

As duas populações apresentaram altos índices de diversidade haplotípica e baixos níveis de diversidade nucleotídica, o que sugere a expansão a partir de uma população ancestral de tamanho efetivo pequeno. Porém, os testes de neutralidade  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima não evidenciaram essa expansão, sugerindo que mesmo que as populações sejam pequenas e restritas ao local, elas conseguem manter um equilíbrio entre a taxa de nascimentos e mortalidade.

O compartilhamento do haplótipo H3 por essas duas populações sugere que possivelmente a colonização de *Lu. longipalpis* no Panamá se deu pela dispersão de indivíduos da Ilha Boná para o Continente. A origem da ilha Boná data do Mioceno médio, época de maior atividade vulcânica na região do Caribe e Centro América. Nesse período, ocorreu a união de pequenas ilhas que formaram parte do complexo do istmo de Panamá (De Bôer et al. 1988, Coates & Obando 1996). A formação do istmo do Panamá, há cerca de 3,5-5 milhões de anos (Coates & Obando 1996), mais os eventos climatológicos que caracterizaram o Pleistoceno, possivelmente permitiram a migração dessas populações dos fragmentos das ilhas para o continente. Posteriormente, com o aumento (subida) dos níveis da água, essas populações se isolaram e começaram a se diferenciar.

O padrão filogeográfico observado na rede de haplótipos e os valores de  $F_{st}$  obtidos quando se comparou populações do Panamá com as da Costa Rica, Colômbia e Brasil evidenciaram as dissimilaridades entre as mesmas, corroborando os padrões obtidos por Soto et al. (2000), Arrivillaga et al. (2001), ao analisar sequências dos genes NAD4 e COI, respectivamente. Estes dados sugerem que barreiras geográficas, como montanhas e rios, aliadas à limitada capacidade de dispersão de *Lu. longipalpis* levam ao isolamento geográfico dessa espécie (Arrivillaga et al. 2001). A alta estruturação genética detectada no presente trabalho reflete o isolamento reprodutivo de populações de *Lu. longipalpis* da Costa Rica, Colômbia e Brasil detectado nos estudos de entrecruzamento e análises isoenzimáticas realizados por Lanzaro et al. (1993) e Mutebi et al. (2002).

Os resultados de diferenciação genética e tempo de divergência obtidos nessa análise comparativa revelaram que as populações do Panamá são mais próximas à do Brasil. Isto sugere que o Brasil pode ter sido o centro de origem da população panamenha. Assim, talvez, a dispersão de *Lu. longipalpis* se deu antes da formação do istmo do Panamá para os fragmentos de ilhas e, posteriormente, a espécie se dispersou para o continente, como discutido anteriormente. Entretanto, considerando que a essa espécie é encontrada até no México, amostras das populações da América Central e do México são necessárias para confirmar este padrão.

A estruturação observada nessa rede de haplótipos, portanto, seria o resultado de processos de vicariância, no caso, a formação das barreiras geográficas Andina-Amazônicas, no plioceno tardio e pleistoceno (Arrivillaga et al. 2001). Assim, o tempo de divergência estimado indica que as populações de Panamá diferenciaram-se das populações da América do Sul a partir do Pleistoceno médio.

O estabelecimento de *Lu. longipalpis* no continente panamenho e a recente dispersão ao peridomicílio, devido à destruição de habitats naturais pelas atividades humanas, torna-se um risco epidemiológico. Embora no Panamá ainda não existam registros de leishmaniose visceral, vários mamíferos reservatórios de *Le. infantum chagasi* estão presentes tanto nesse país como na América do Sul (Rangel & Lainson 2003). Portanto, a existência do componente vetor-hospedeiro do ciclo da leishmaniose é um evento que deve ser considerado nos programas de controle vetorial nesses locais.

Concluindo, as análises realizadas revelaram uma alta diversidade e diferenciação genética entre as populações de *Lu. longipalpis* tanto do Panamá, quanto dessas em relação às populações da Costa Rica, Colômbia e Brasil. A reconstrução histórica dessas populações sugere um período de dispersão e posterior isolamento, a

partir das populações do Brasil. O fato de se ter encontrado *Lu. longipalpis* no peridomicílio no Panamá é importante como fator de risco e para incrementar a vigilância epidemiológica. A presença da espécie e as variações genéticas avaliadas devem ser consideradas em programas de controle vetorial, principalmente quando se considera as atuais alterações e destruição dos habitats naturais, o que pode aumentar a distribuição geográfica da espécie e levar à possível emergência da doença.

### **Agradecimentos**

Para a Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología Innovadora (SENACYT), Instituto Commemorativo Gorgas (ICGES) e Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), pelo apoio logístico nas coletas de flebotomíneos no Panamá. Para Maykon Cristiano Passos, pelo auxílio no laboratório e análise de dados.

### **Referências**

- Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC (2002) Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol* 2: 83-95.
- Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, de Andrade PP, et al. (2006) Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Trop* 98: 15-24.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Mol Biol* 11: 315-323.
- Coates AG, Obando JA (1996) Geological evolution of the Central American Isthmus. In Jackson JBC, Budd AF, Coates AG editors. *Evolution and environment in tropical America*: Chicago: University of Chicago Press. pp. 21-56.
- Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MA, Balbino VQ, et al. (2008) *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco river in the speciation of this sand fly vector. *Parasit Vectors* 1: 16.
- Christensen H, Fairchild GB, Herrer A, Johnson C, Young D, et al. (1983) The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 20: 463-484.
- Christensen HA, Herrer A, Telford SR (1972) Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. II. Entomological investigations. *Ann Trop Med Parasitol* 66: 55-66.
- De Bôer JZ, Defant MJ, Stewart RH, Restrepo JF, Clark LF, et al. (1988) Quaternary

- calc-alkaline volcanism in western framework. *J S A Earth Sci* 1: 275-293.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Garcés P, Araúz E, Morales Z (1999) Determinación de Phlebotominae: *Lutzomyia* spp, en un área boscosa del Parque Nacional Altos de Campana, Distrito de Capira, Provincia de Panamá. *Scientia* 2: 35-47.
- Hamilton, JGC, Dawson, GW, Pickett, JA (1996) 3-Methyl-a-himachalene; proposed structure for the novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J Chem Ecol* 22: 2331-2340.
- Herrer A, Christensen HA (1973) Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 25: 54-58.
- Hodkinson VH, Birungi J, Quintana M, Dietze R, Munstermann LE (2003) Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 386-392.
- Huelsenbecker JP, Ronquist, F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics tree. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Lainson R, Shaw JJ (1998) New world Leishmaniasis the neotropical *Leishmania* species. In Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. London: Edward Arnold press. pp. 42-266.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A (1993) *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg* 48: 839-884.
- Lanzaro GC, Lopes AH, Ribeiro JM, Shoemaker CB, Warburg A, et al. (1999) Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Mol Biol* 8: 267-275.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, et al. (2003) Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil. *Mol Ecol* 12: 1879-1894.
- Mangabeira O (1969) Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Rev Bras Malariol D Trop* 21: 3-25.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES (2002) Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Plebotominae). *Rev Inst Med*

Trop Sao Paulo 44: 255-259.

Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML (1993) Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol 30: 427-435.

Mutebi JP, Tripet F, Alexander JB, Lanzaro GC (2002) Genetic differentiation among populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central and South America. Ann Entomol Soc Amer 95: 740-752.

Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. System Biol 53: 47-67.

Parvizi P, Assmar M (2007) Nuclear elongation factor1- $\alpha$  gene, A molecular marker for Iranian sandfly identification. Iranian J Publ Health 36: 25-37.

Quinnell RJ, Dye C (1994) An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). Bull Entomol Res 84: 379-382.

Rangel EF, Lainson R (2003) Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In Rangel EF, Lainson R, editors. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. pp. 291-310.

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

Service MW (1991) Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. Rev Saude Publ 25: 165-178.

Soto, SI, Lehmann T, Rowton ED, Velez BID, Porter CH (2001) Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Mol Phylogen Evol 18: 84-93.

Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP, Peixoto AA (2002) Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 102-103.

Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, et al. (2004) Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. J Med Entomol 41: 906-913.

Sudia WD, Chamberlain RW (1962) Battery operated light trap, an improved model. Mosq News 22: 126-129.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105: 437-460.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-2739.

Testa JM, Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD (2002) Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop* 84: 205-218.

Theodor O (1965) On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* 2: 171-197.

Valderrama A, Herrera M, Salazar A (2008) Relación entre la composición de especies del género de *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. *Acta Zool Mex (n.s.)* 24: 67-78.

Valderrama A, Tavares MG, Andrade Filho DJ (2011) Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 1049-1051.

Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH (1993) Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitol* 106: 55-75.

Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos T Roy Soc B* 29: 223-230.

Ward RD, Ribeiro AL, Ready PR, Murtagh A (1983) Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 269-280.

Ward RD, Ribeiro AL, Ryan L, Falção AL, Rangel EF (1985) The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 145-148.

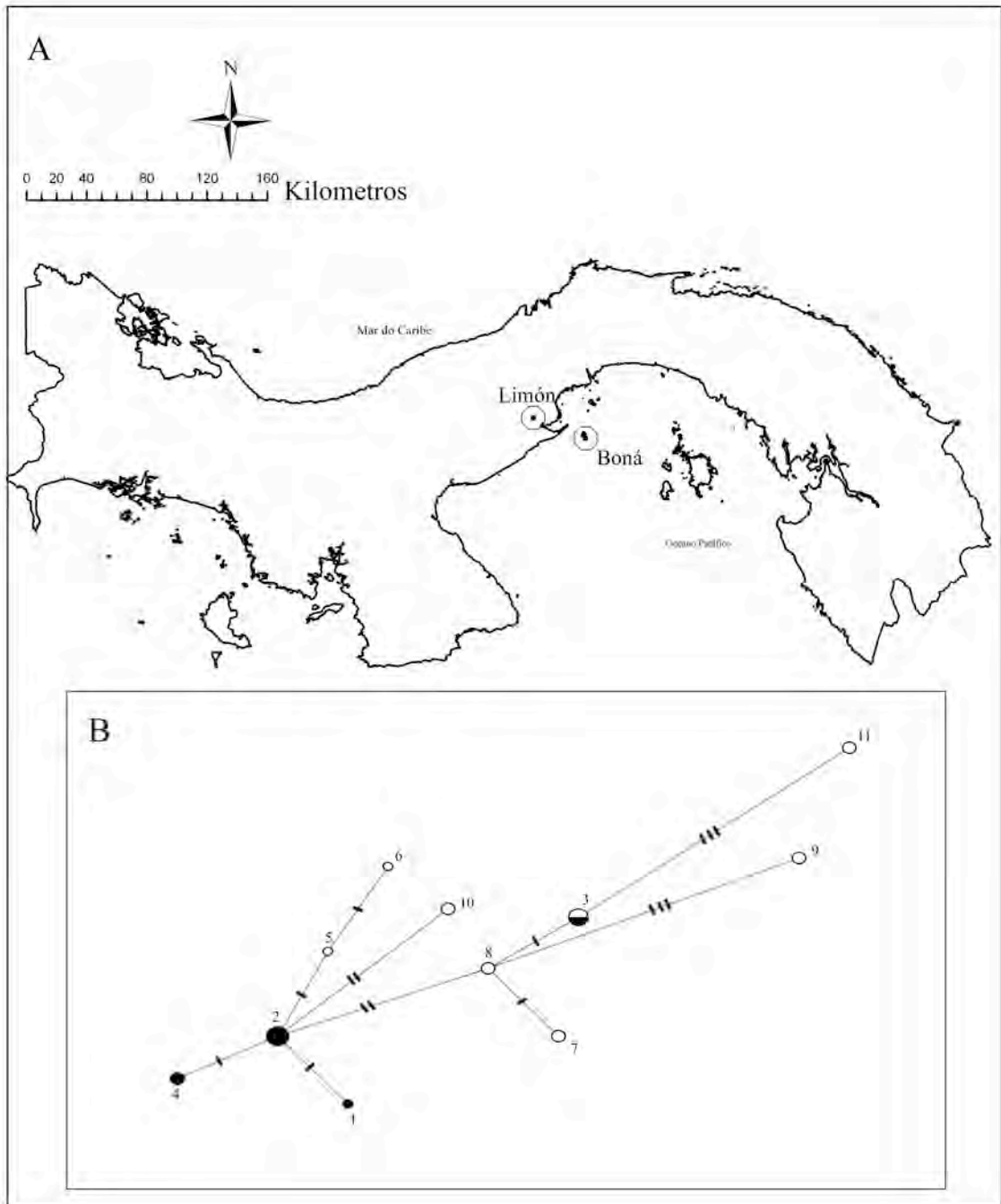
Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst* 54: 1-881.

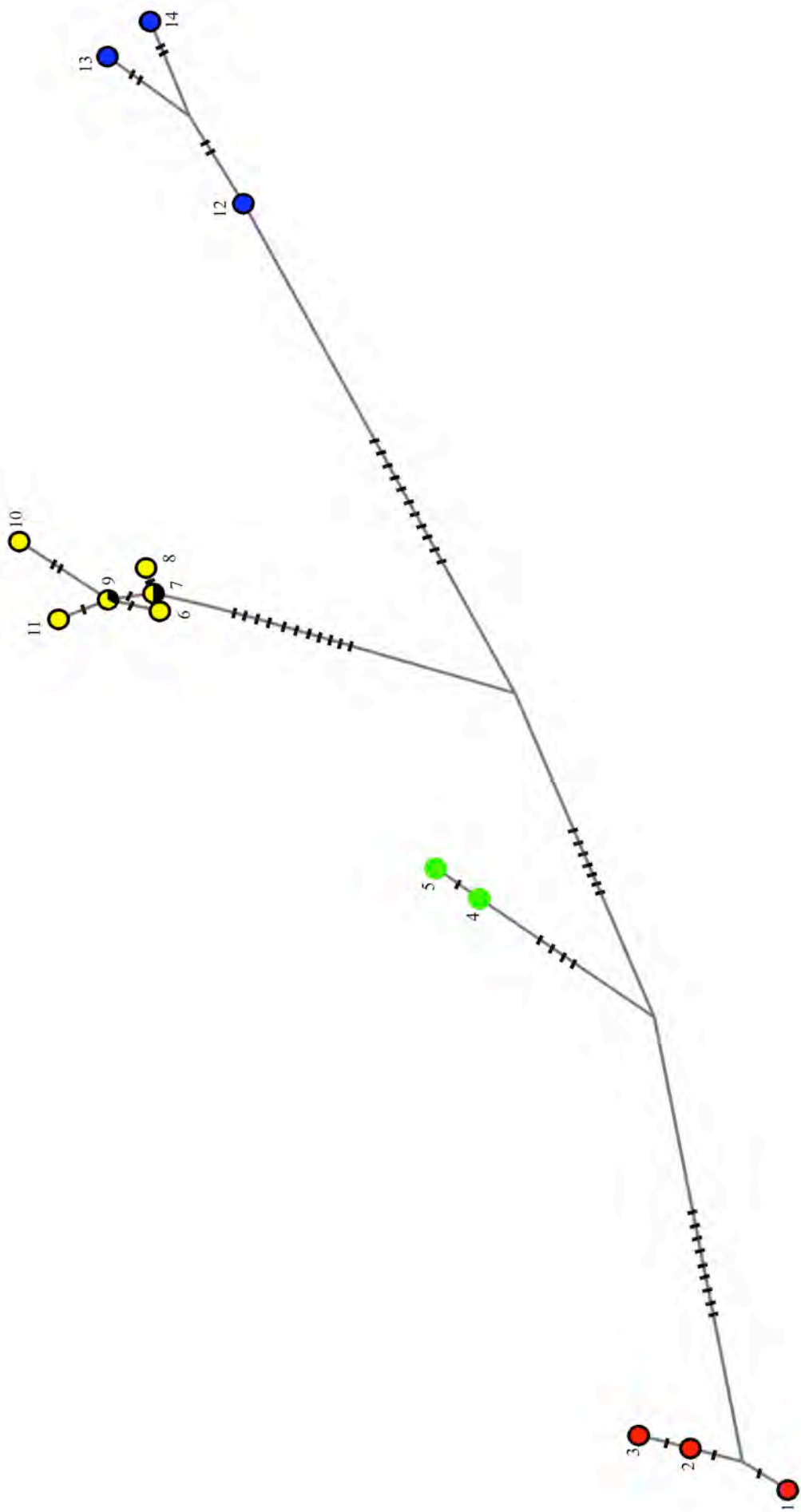
Zeledón R, Hidalgo H, Viquez A, Urbina A (1989) Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 786.

## Legendas das Figuras

Fig. 1. Distribuição geográfica das duas populações de *Lutzomyia longipalpis* coletadas no Panamá (a) e rede de haplótipos das sequências mitocondriais e nucleares concatenadas (b). Cada círculo representa um haplótipo e são proporcionais às frequências haplotípicas. Os círculos pretos e brancos representam os haplótipos encontrados na Ilha Boná e em Limón, respectivamente. Os traços entre os haplótipos indicam o número de mutações.

Fig. 2. Rede de haplótipos de sequências mitocondriais do citocromo b de *Lutzomyia longipalpis* coletados no Brasil (vermelho), Costa Rica (verde), Panamá (amarelo e preto) e Colômbia (azul). Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional à sua frequência haplotípica. Os traços entre os haplótipos indicam o número de mutações. Os valores entre parêntesis são os valores da probabilidade *a posteriori* da inferência Bayesiana.





### III. CONCLUSÕES GERAIS

A fragmentação ambiental para atividades antropogênicas no Panamá, tem ampliado a distribuição geográfica das três principais espécies vetores de leishmaniose cutânea, *Lutzomyia panamensis*, *Lu. gomezi* e *Lu. trapidoi*. A fragmentação ambiental também é responsável pelo deslocamento dessas espécies e de *Lu. longipalpis* ao peridomicílio, sendo, portanto, um fator de risco para o aumento de casos da leishmaniose.

As diferenças genéticas detectadas nas populações de *Lu. gomezi* e de *Lu. longipalpis* são determinadas principalmente pelas barreiras geográficas, que interferem na distribuição altitudinal e longitudinal das espécies. Entretanto, características climáticas e vegetativas também podem ser fatores que contribuem para essa diferenciação.

A presença de *Lu. gomezi* no Panamá pode estar relacionada com os eventos tectônicos que deram origem ao istmo de Panamá, o qual pode ter servido de ponte para a migração e estabelecimento dos flebotomíneos nesse país.

A inexistência de estruturação genética entre algumas populações de *Lu. gomezi* pode ser explicada pela existência de fluxo gênico entre as mesmas.

O padrão de distribuição geográfico de *Lu. longipalpis*, inferido neste estudo, sugere a dispersão a partir da América do Sul, seguido de processos de vicariância.