ANTÔNIO CARLOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DE
LUTZOMYIA INTERMEDIA, S.LAT. (LUTZ & NEIVA, 1912) PARA
LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS, VIANNA, 1911 E SUAS
IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Saúde Pública da Universidade de São Paulo,
Departamento de Epidemiologia, para obtenção
de título de Doutor em Saúde Pública.**

ORIENTADOR: PROF. DR. ALMÉRIO DE CASTRO GOMES

SÃO PAULO

1998

Ao Prof. Dr. Almério de Castro Gomes, pela eficiente orientação, amizade e por tudo que pude aprender, o meu sincero reconhecimento.

Ao casal D. Tereza e Sr. José Lopes, moradores do Vale do Ribeira, pela cordial acolhida, confiança e disponibilidade incondicional.

À Deus, por tudo ...

Aos meus pais, pela vida .

À minha família, em especial Cássia, Eider e Renar pelo carinho, compreensão e incentivo sempre presentes.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e à Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela oportunidade oferecida.

Aos professores do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública e, em especial, Prof. Dr. Délsio Natal, Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati e Prof. Dr. José Maria Soares Barata, pelo estímulo e amizade.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas da E.F.O.A e, em especial, Prof. Cleuton Cândido Landre, pelo apoio incondicional, enquanto chefe do Departamento.

Aos Professores Mauro Braga e Rosângela Vieira Siqueira pela amizade, colaboração e suprimento de minhas ausências no Laboratório de Parasitologia Clínica da E.F.O.A.

Aos funcionários do Departamento de Epidemiologia da F.S.P e do Departamento de Análises Clínicas da E.F.O.A, pela colaboração e amizade.

À Profa. Dra. Elizabeth Ferreira Rangel, chefe do Laboratório de Vetores de Leishmaniose e Oncocercose da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) pelo estágio sobre técnicas de criação de flebotomíneos .

Ao Prof. Dr. Jeffrey J. Shaw do Instituto Evandro Chagas da Fundação Nacional de Saúde (PA) pelo suprimento das estirpes de ***L.(V.) braziliensis*** e estágio no Laboratório de Parasitologia - Programa de Leishmaniose

Aos funcionários da Biblioteca da F.S.P., pela atenção especial e colaboração na revisão das Referências Bibliográficas.

Ao Prof. Beno Kuehne do Departamento de Ciências Biológicas da E.F.O.A, pela execução do trabalho fotográfico.

À Prof. Dra. Cássia Carneiro Avelino, pela dedicação e cuidado na digitação e montagem da tese.

À Odete Maria Inocência Barbosa do Departamento de Epidemiologia da F.S.P., pelo auxílio nas dissecações dos insetos.

Ao Prof. Vinicius Vieira Vignoli, Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade de Alfenas, pela elaboração do summary.

Ao Prof. José Antônio Leite, do Departamento de Ciências Exatas da E.F.O.A, pela orientação do trabalho estatístico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo indispensável auxílio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO v

SUMMARY viii

INTRODUÇÃO 1

OBJETIVOS 11

MATERIAL E MÉTODOS

 - Região estudada 13

 - Grupos experimentais 16

 - Resumo do modelo experimental 34

RESULTADOS

 - Flebotomíneos dissecados 41

 - Testes de suscetibilidade 43

 - Testes de infectividade 53

 - Colonização de *Lutzomyia intermedia* 57

DISCUSSÃO

 - Avaliações epidemiológicas 67

 - Avaliações experimentais 83

 - Colonização de *Lutzomyia intermedia* 100

 - Mortalidade na colonização 116

CONCLUSÕES 126

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo recrudescer após duas décadas de baixa incidência anteriores a 1970, mesmo em áreas sem cobertura de vegetação primária. Na região do Vale do Ribeira (SP), essa doença não guarda relação com o desflorestamento mas com habitações humanas.

Estudos ecológicos têm demonstrado a possível participação de *Lutzomyia intermedia*, *s. lat.*, como vetora da parasitose nesta área geográfica. Entretanto, um número maior de informações relativas à competência natural e experimental é necessário para melhor definir seu papel vetorial.

Este estudo teve por objetivo pesquisar infecção natural em *Lutzomyia intermedia*, testar a suscetibilidade dessa espécie frente a duas estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* procedentes da região amazônica "M2903" e Vale do Ribeira "7312". Subseqüentemente, tentar transmiti-las à hamsters não infectados mediante picada de exemplares colonizados infectados e, macerados de exemplares silvestres infectados. Além disso, estabelecer uma colônia dessa espécie de flebotomíneo para suprir os experimentos com exemplares colonizados .

Como resultados, não detectamos flagelados nos exemplares pesquisados (n= 5.448). Nos experimentos de suscetibilidade 64 (76%) exemplares silvestres se infectaram com a estirpe "M2903" e 59 (72%) com a estirpe "7312". Para os colonizados, 53 (67%) e 62 (73%) exemplares se infectaram com essas estirpes, respectivamente .

Nos experimentos de transmissão via picada, 39 exemplares supostamente infectados com a estirpe "M2903" foram expostos à realimentação

em hamsters não infectados. De 03 exemplares que se realimentaram, 02 estavam infectados. Para a estirpe “7312”, dos 43 exemplares que foram expostos à realimentação, 02 exemplares realimentaram, sendo encontrado 01 infectado. Em ambos experimentos, entretanto, não foram encontrados hamsters positivos para ***Leishmania*** após picada desses insetos.

Nos experimentos de transmissão via macerados, 20(57,1%) hamsters desenvolveram lesões com a estirpe “M2903” e 22 (68,7%) também o fizeram em relação à estirpe “7312”.

As dissecações de ***Lutzomyia intermedia*** realizadas no 7º dia após o repasto sangüíneo infectivo, evidenciaram formas evolutivas de ***Leishmania (V.) braziliensis*** colonizando o piloro e o estômago anterior (cárdia e proventrículo), realçando o modelo “Peripilária” de desenvolvimento dos parasitos do complexo ***braziliensis*** frente a essa espécie de flebotomíneo.

Com relação à colonização de ***Lutzomyia intermedia***, o ciclo completo de desenvolvimento deu-se, em média, em 39,6 dias. O rendimento das colônias para adultos alados de primeira geração foi de 24,3% a partir de ovos, 41,6% a partir de larvas e, 92,4% a partir de pupas. Os maiores percentuais de mortalidade de elementos ocorreram na oviposição com 35,3%, não eclosão de ovos com 41,6% e morte de larvas no primeiro estágio com 33,6%.

Diante do exposto, concluímos que as avaliações de caráter experimental, mostraram que a espécie ***Lutzomyia intermedia***, foi suscetível a diferentes estirpes de ***Leishmania (V.) braziliensis***, propiciando a multiplicação e/ou desenvolvimento desse agente infeccioso no seu trato digestivo.

Quanto a inexistência da comprovação de infecções naturais para ***Lutzomyia intermedia***, permaneceria ainda inconclusivo o seu papel vetorial. Entretanto, a associação entre avaliações epidemiológicas e experimentais nos permite indicar essa espécie como a que reuniria o maior número de atributos necessários para transmitir o agente infeccioso ao homem. Além disso, reitera-se a viabilidade da colonização dessa espécie de flebotomíneo com propósito de estudos experimentais.

SUMMARY

The American cutaneous leishmaniasis in São Paulo State recrudescence after two decades of low incidence earlier the 1970, even in areas without cover of primary vegetation. In the Vale do Ribeira region (SP), this disease doesn't have relation with deforestation but have with dwelling places.

Ecological studies have shown the possibility of *Lutzomyia intermedia*, *s. lat.*, is participating as the vector of this parasitosis in this region. However, a higher number of informations referring to the natural and experimental competency are essential to define its vectorial role.

The purpose of this study was to research natural infection in *Lutzomyia intermedia*, to test the susceptibility of this species to two strains of *Leishmania (V.) braziliensis*, from Amazon region "M2903" and Vale do Ribeira "7312 ". Subsequently, try to transmit the strains to non infected hamsters, through either the bites made by infected colonized species, or macerates from infected wild insects, besides forming a colony of this sand fly species to supply the experiments with colonized samples.

As results, we have not detected any flagellates among the samples under research (n = 5.448) .

In the susceptibility experiments, 64 (76%) wild samples were infected with the "M2903" strain, and 59 (72%) with the "7312" strain. As for the colonized, 53 (67%) and 62 (73%) specimens were respectively infected with these strains.

In the bite-transmission experiments 39 specimens, supposedly infected by the "M2903" strain, were exposed to refeeding in clean hamsters. From 03 refed specimens, 02 were infected. As regard the "7312" strain, 43 especimens that were exposed to refeeding, 02 refed, one of them being infected. In both experiments, however, no hamster was positive for *Leishmania* after the insect bite.

In the macerate-transmission experiments, 20 (57,1%) hamsters showed lesion with the “M2903” strain, and 22 (68,7%) with the “7312” strain.

Dissections of *Lutzomyia intermedia* carried out on the 7th day after the infective blood refeeding revealed evolutive forms of *Leishmania (V.) braziliensis* colonizing the pilorus and anterior stomach (cardia and proventriculus), emphasizing the “Peripylaria” parasite developmental model of the *braziliensis* complex in face of this sand fly species.

As regards the *Lutzomyia intermedia* colonization, the complete developmental cycle occurred in 39,6 days, in average. The yield of the colonies into first generation winged adults was equal to 24,3% starting from eggs, 41,6% from larvae, and 92,4% from pupae. The highest mortality rates occurred on oviposition (35,3%), non eclosion of eggs (41,6%), and larval death on the first stage (33,6%).

The experimental evaluations lead us to conclude that the species *Lutzomyia intermedia* was susceptible to different strains of *Leishmania (V.) braziliensis*, favoring the multiplication and/or development of this infecting agent in the digestive tract.

As for the inexistence of confirmation of natural infections to the *Luutzomyia intermedia*, its vectorial role would stay inconclusively. However, the association of epidemiological and experimental evaluations, allows us to consider this species as one having the most necessary attributes to transmit the infectious agent into humans. In addition, the viability of this sand fly species colonization with the purpose of experimental studies is reaffirmed.

1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada, essencialmente, uma zoonose de animais silvestres, cuja transmissão depende em grande parte de certas espécies de flebotomíneos das florestas primitivas. A participação do homem no ciclo acontece geralmente de forma acidental, pelo contato com parasitos em biocenose naturais onde se mantém os seus ciclos enzoóticos (Bastos, 1978; Gomes, 1992; Peters, 1993).

A epidemiologia da LTA tem adquirido aspectos diversificados, dependendo do tempo e espaço. Durante o processo de colonização das Regiões Sul e Sudeste, foram registrados diversos surtos epidêmicos, envolvendo frequentemente trabalhadores de matas e de serviços de derrubadas, os quais penetravam no habitat natural da *Leishmania*. Os adultos do sexo masculino eram os mais atingidos, principalmente os da faixa etária entre 20 e 30 anos. Esses surtos epidêmicos possuíam então, componentes que os caracterizavam como de comportamento ocupacional (Rey, 1991).

Com a drástica redução da vegetação natural naquelas Regiões foi observado concomitantemente um declínio da incidência da LTA, o que veio posteriormente originar outros perfis epidemiológico desta parasitose. Nesta nova situação, a infecção humana passou a predominar em áreas desmatadas e de colonização antiga, cuja endemicidade configura-se em micro-surtos que se caracterizam como de ocorrência cíclica ou com casos esporádicos, sem uma compreensão causal definida (Gomes, 1992). Dado que houve o quase desaparecimento da Floresta Atlântica, o tipo clássico de transmissão humana predomina ainda em áreas de ocupação da Amazônia. Assim, as condições de transmissão atual da LTA pode ser analisada diferentemente para as Região Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Tolezano *et al.*, 1980; Gomes, 1992).

A região denominada Vale do Ribeira, está situada ao sul do Estado de São Paulo e inserida no conjunto do ecossistema litorâneo da Serra do Mar, com 12 municípios espalhados em 12.129 Km² de área. Segundo dados da Fundação SEADE (1992) o censo demográfico de 1991 revelou população de 227.266 habitantes, dos quais 39,2% residindo na zona rural. Aqui, diferentemente de outras regiões do Estado, existe um bom predomínio de mata primitiva. Entretanto, nunca foi vista como ambiente muito infeccioso para o homem.

Os primeiros estudos realizados para se conhecer a abrangência da LTA no Estado de São Paulo, indicaram o Vale do Ribeira como área indene, embora alguns casos diagnosticados na cidade de São Paulo pudessem ser oriundos dessa região (Pessôa & Pestana, 1940; Forattini & Oliveira, 1957). Contudo, foi a partir da década de 80 que esta parasitose passou a ser disseminada por quase todos os seus municípios, como demonstram os registros de 914 casos autóctones diagnosticados no período de 1981 - 1995 (Fonte: CVE/SUCEM, 1996).

Desde o encontro dos primeiros casos autóctones de LTA naquela região, foram realizados diversos estudos envolvendo alguns determinantes de sua distribuição. A análise dos resultados obtidos, indicou que a parasitose tinha incidência em ambos os sexos (Forattini & Oliveira, 1957; Forattini *et al.*, 1973; Bastos, 1978; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Tolezano *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1992). Sua distribuição etária foi verificada em indivíduos nas mais diferentes idades, valendo ressaltar, que dentre 221 pessoas com a parasitose, 63 (28,5%) encontravam-se na faixa etária até 10 anos (Forattini & Oliveira, 1957; Bastos, 1978; Tolezano *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1992).

Quanto à ocupação dos pacientes, foi verificada a ocorrência da LTA em trabalhadores como palmiteiros, roçadores de matas e lenhadores, os quais obtêm o seu sustento na floresta (Forattini & Oliveira, 1957; Forattini *et al.*, 1973; Rocha e Silva *et*

al.,1980). Entretanto, a parasitose foi também diagnosticada em estudantes, agricultores, professor, funcionário público, vigias e domésticas (Tolezano *et al.*,1980).

A avaliação desses indicadores epidemiológicos demonstrou que a LTA no Vale do Ribeira, sempre apresentou feições distintas em relação a outras regiões brasileiras e sul americanas, particularmente quanto ao contato do homem com a ***Leishmania***, onde a infecciosidade nas matas da Serra do Mar revelou não ser tão evidente quanto as outras áreas do Estado. Assim, uma taxa de infecção humana da parasitose proporcional a ambos os sexos e incidente em diversas faixas etárias, e a verificação que alguns indivíduos portadores da parasitose não haviam entrado em contato com áreas silvestres, fizeram com que alguns autores avertissem a possibilidade de transmissão domiciliar e peridomiciliar. Isto em parte, justificada pela presença constante de ***Lutzomyia intermedia*, s.lat.** (Marcondes, 1996).

Considerando ainda, a diversidade de ocupações exercidas pelos pacientes com LTA, observa-se que esta nem sempre possuía características que pudessem lhes conferir aspecto de doença profissional. Assim, no Vale do Ribeira, os casos detectados ocorreram em sua maioria, sem que houvesse alguma evidência simultânea com o desflorestamento ou participação efetiva do contato do homem com a floresta. Subseqüentemente, a endemidade da moléstia vem sendo mantida, graças à ocorrência de casos isolados no ambiente extra-florestal, os quais podem se agrupar em determinados períodos, configurando caráter explosivo de incidência (Gomes *et al.*,1992).

Nas décadas de 40 e 50, estudos sobre a fauna flebotomínea realizados em áreas com alta incidência da parasitose no Estado de São Paulo, indicaram as espécies silvestres, ***Lutzomyia whitmani*** , ***L. migonei*** , ***L. pessoai*** e ***L. fischeri*** como as de maiores prevalências, com dominância exercida em muitas áreas pela primeira

espécie (Barretto,1942; Forattini, 1954). Essas espécies foram consideradas como as principais responsáveis pela transmissão da parasitose devido às suas antropofilias e, pelo encontro de alguns exemplares naturalmente infectados, exceto para ***L. fischeri*** (Pessoa & Pestana,1940; Pessoa & Coutinho, 1940; 1941; Tolezano, 1994; Gomes,1994).

Apesar da intensa devastação do ambiente florestal primitivo não ter sido suficiente para conduzir à extinção daquelas populações antropófilas, seu efeito pode ser retratado na redução de suas densidades. Conseqüentemente, os hábitos e habitats dessas populações foram sendo alterados em concordância com suas adaptibilidades individuais (Gomes *et al.*,1989; Gomes,1994).

Atualmente, admite-se que os focos enzoóticos de ***Leishmania*** permaneçam ativos, mas estejam muito reduzidos, sendo mantidos possivelmente em refúgios isolados nas matas residuais. Nesses locais, ainda que ocorrendo flutuações da densidade populacional, para ***L. whitmani*** e ***L. pessoai*** os seus habitats remanescentes subsistem a cada dia em menor número (Gomes *et al.*,1989; Taniguchi *et al.*,1991). Entretanto, devido a redução de suas abundâncias, parecem ter apenas papel secundário na transmissão humana da parasitose (Gomes,1994).

No modelo epidemiológico emergido do deflorestamento destaca-se o ambiente extra-florestal, constituído principalmente pelo ambiente domiciliar. Nesta nova situação ecológica, estudos realizados (Forattini *et al.*,1976; Gomes *et al.*,1989; Taniguchi *et al.*,1991; Stolf *et al.*,1993) demonstraram que nesse ambiente, a transmissão do parasito parecia depender das espécies ***L. whitmani*** , ***L. migonei***, ***L. fischeri*** e, principalmente, de ***L. intermedia***.

No Vale do Ribeira, a devastação do ambiente natural também alterou a composição da fauna flebotomínea com a espécie ***L. intermedia*** passando a ocupar a

condição de população dominante em ambientes antrópicos. Para tanto, certamente contribuiu a apreciável valência ecológica que possui essa espécie, a qual é dotada de comportamento euritopo (Gomes *et al.*, 1980).

Estudos eco-epidemiológicos realizados na região, demonstraram que *L. intermedia* tem comportamento antropofílico (Rocha e Silva *et al.*, 1980; Gomes *et al.* 1983; Gomes & Galati, 1989), endofílico (Forattini *et al.*, 1976; Bastos, 1978; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1986;), atividade noturna (Gomes *et al.*, 1983) e acentuado grau adaptativo a ecótopos artificiais (Gomes *et al.*, 1980, 1982). Assim, foi atribuída a essa espécie a capacidade de ultrapassar barreiras em ambiente aberto, com conseqüente estabelecimento de criadouros extra-florestais (Gomes & Galati, 1987; Taniguchi *et al.*, 1991).

Lutzomyia intermedia, no ambiente antrópico, revelou-se também adaptado às margens de matas e capoeiras (Gomes & Galati, 1987), com presença constante e expressiva em domicílios e peridomicílios (Forattini *et al.*, 1976; Bastos, 1978; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1986; Gomes & Galati, 1989; Gomes *et al.*, 1990) bem como em abrigos de animais domésticos. Estes, principalmente, se localizados próximos a áreas com cobertura vegetal, devido possivelmente, à adaptação da espécie ao "efeito marginal" ali existentes (Gomes *et al.*, 1980).

Em ambiente florestal secundário, a densidade populacional do *L. intermedia* é variável, podendo apresentar-se bastante diminuída (Gomes *et al.*, 1983; Gomes *et al.*, 1990), ou de forma predominante em relação a outras espécies (Forattini *et al.*, 1976; Gomes & Galati, 1987).

Estudos relativos à capacidade vetorial de flebotomíneos para transmitirem *Leishmania* tiveram no passado suas conclusões de incriminação vetorial, baseadas

em dados puramente epidemiológicos. Assim, algumas vezes, a espécie era considerada como vetora, simplesmente por se apresentar na área endêmica em densidade populacional maior que de outras espécies, utilizar o homem como fonte hospedeira, ou por terem sido encontrados exemplares portando flagelados, nem sempre identificados, em seus tubos digestivos.

Segundo Killick-Kendrick e Ward (1981), somente evidências epidemiológicas não seriam suficientes para incriminar uma determinada espécie como vetora efetiva da parasitose. Com o intuito de se colocar em suspeita uma determinada espécie de flebotomíneo como vetora das leishmanioses, estes autores sugeriram a seguinte série de investigações em ordem crescente de dificuldades :

- 1) os exemplares deveriam ser antropofílicos em maior ou menor grau;
- 2) a distribuição espacial dos exemplares deveria ser coincidente com a área geográfica onde estivesse ocorrendo os casos de infecção humana, além de que, esses exemplares deveriam estar em número suficientemente abundante, para que fosse possível manter a transmissão natural do parasito;
- 3) os exemplares encontrados naturalmente infectados por formas flageladas, essas deveriam ser identificadas como pertencentes à mesma espécie de ***Leishmania*** que infecta o homem, na mesma área geográfica;
- 4) os exemplares naturalmente ou experimentalmente infectados com ***Leishmania*** deveriam manter, em laboratório, todas as etapas do desenvolvimento parasitário;
- 5) consideraria como prova conclusiva de incriminação vetorial, a capacidade desses insetos de transmitirem experimentalmente o parasito por sua picada.

Atualmente, baseados na sequência destes critérios acima descritos (considerados no todo ou em partes), são relacionadas 81 espécies de flebotomíneos como possíveis vetoras, no Velho e Novo Mundo. Dessas, apenas 11 espécies do

gênero *Phlebotomus* e 08 do gênero *Lutzomyia* é que tiveram suas capacidades vetoriais já comprovadas (Killick-Kendrick, 1990).

Leishmania (V.) braziliensis, um dos agentes etiológicos da LTA, tem como vetores comprovados flebotomíneos das espécies *Lutzomyia wellcomei* e *L. carrerai carrerai* e, 13 outras espécies consideradas como suspeitas de exercerem atividade vetorial (Killick-Kendrick, 1990). Dentre essas, destaca-se no Brasil, nas Regiões Sul e Sudeste, a espécie *L. intermedia* (Lainson & Shaw, 1987; Dedet, 1993; Lainson *et al.*, 1994).

A suspeita de que a espécie *L. intermedia* fosse dotada de competência vetorial deveu-se a: encontro de alguns exemplares naturalmente infectados (Aragão, 1922; Forattini & Santos, 1952; Forattini *et al.*, 1972; Rangel *et al.*, 1984); pela tentativa de reproduzir a infecção em animais com flagelados isolados desses insetos (Aragão, 1922; Forattini *et al.*, 1972) e pelos resultados dos trabalhos de infecção experimental de exemplares de *L. intermedia* com *Leishmania (V.) braziliensis* (Coelho *et al.*, 1967; Rangel *et al.*, 1992).

No Vale do Ribeira, os resultados dos estudos envolvendo os determinantes epidemiológicos da LTA, somados àqueles de caráter biológico e ecológico da fauna flebotomínea, sugeriram *L. intermedia* como a espécie de maior potencialidade vetorial para transmitir a parasitose em ambientes domiciliares na região (Tolezano, 1994; Gomes, 1994). Porém, as sucessivas investigações para o encontro de sua infecção natural continuam sem sucesso, ensejando estudos experimentais que possam trazer novos subsídios para melhor compreensão do relacionamento entre *L. intermedia* / *Leishmania braziliensis*.

Justificativa

No Estado de São Paulo, mesmo após a devastação das florestas naturais, a parasitose tem sido notificada na maioria de seus municípios, evidenciando uma evolução epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana. A análise dos diversos aspectos, anteriormente descritos, evidencia entretanto, persistência de questões ainda obscuras que necessitam de estudos complementares para melhor compreensão da sobrevivência de ***Leishmania*** nos novos ambientes, onde vem produzindo outros perfis epidemiológicos. Destacam-se entre elas:

- identificar as diferentes espécies e estirpes de ***Leishmania*** circulando entre humanos, flebotomíneos, animais domésticos e silvestres;
- identificar os reservatórios silvestres especialmente de ***Leishmania (V.) braziliensis***;
- identificar as espécies de flebotomíneos que poderiam ter papel vetorial principal ou secundário nas áreas endêmicas;
- definir a importância de animais domésticos encontrados naturalmente infectados, no ciclo da ***Leishmania*** ;
- determinar os fatores biológicos, ecológicos e biogeográficos que se interrelacionam e que poderiam contribuir para a dispersão e manutenção da ***Leishmania*** em ambientes antrópicos.

Nas áreas de colonização antiga do Estado, os ciclos enzoóticos da ***Leishmania*** foram revelados através de encontros esporádicos do parasito em possíveis reservatórios silvestres e em algumas espécies de ***Lutzomyia* sp.** Nesses insetos, os flagelados foram relacionados à ***Leishmania (V.) braziliensis***, embora sem nenhuma caracterização laboratorial. Por isso, ainda hoje não foram estabelecidas as

diferentes espécies de vetores e animais silvestres que poderiam ser considerados como hospedeiros deste parasito.

Para a região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, o quadro epidemiológico de indefinições é o mesmo em relação àquelas áreas de colonização mais antigas do Estado. Os estudos epidemiológicos existentes sugeriram que a transmissão de ***Leishmania***, em muitos casos, poderia estar ocorrendo no ambiente domiciliar (áreas suburbanas ou em zonas rurais) conferindo assim para a região um ciclo epidemiológico diferenciado. Esse, constituído por reservatórios silvestres ou domésticos, ainda não evidenciados, onde a única espécie do parasito até agora isolada foi ***Leishmania (V.) braziliensis***, oriunda de casos humanos ou animais, aliado a uma presença constante de ***L. intermedia***. Na maioria das vezes esse flebotomíneo constitui no único representante do ambiente domiciliar. Portanto, torna-se difícil acreditar no papel vetorial de outras espécies autóctones da região.

Assim sendo, a questão vetorial no Vale do Ribeira carece de mais estudos sobre as diversas espécies de flebotomíneos em ambientes domiciliares. O aspecto esporádico ou de insignificante abundância nas habitações humanas das espécies ***L. migonei*** e ***L. fischeri***, impossibilitam reconhecer como tendo papéis epidemiológicos importantes .

Outra questão a ser levantada diz respeito a infecciosidade do ambiente florestal primário da Serra do Mar. Nesse ambiente florestal, ***L. ayrozai*** tem sido uma das espécies silvestres que aparece com maior densidade na isca humana e C.D.C. Este é sem dúvida uma condição indispensável à infecção do homem, todavia, não existem dados suficientes para exercício deste papel silvático na epidemiologia da LTA no Vale do Ribeira.

Com relação à espécie ***L. intermedia***, os estudos realizados revelam, muitas vezes, coincidência de ocorrência flebotomíneo/casos humanos no ambiente domiciliar, além de uma densidade longitudinal flutuante diretamente proporcional aos índices de incidência da doença. Essas verificações aliadas a estudos ecológicos e biológicos fizeram com que a suspeita da responsabilidade pela veiculação de ***Leishmania***, entre a maioria dos indivíduos portadores da parasitose, recaísse sobre essa espécie. Isto porque ela melhor se adaptou a ambientes antrópicos, onde supõe-se possibilitar a circulação do parasito. Mesmo assim, há suspeita de haver um contato mais ocasional entre esse flebotomíneo e ***Leishmania (V.) braziliensis***.

Hipótese do projeto :

Apesar de todas as evidências ecológicas acumuladas indicarem a espécie ***L. intermedia*** como possível transmissora de ***Leishmania (V.) braziliensis***, sua competência vetorial natural e experimental foi pouco estudada. Isto se faz necessário para aceitá-la como espécie vetora, segundo os postulados de Killick-Kendrick & Ward (1981). Assim, a hipótese deste estudo reside na comprovação desta função, motivo pelo qual se investiga a sua infectividade natural e competência experimental para ***Leishmania (V.) braziliensis***. Com isto se confirmaria o relacionamento parasita/hospedeiro bem como corroboraria na definição de seu papel epidemiológico.

2 - OBJETIVOS

Um dos aspectos mais importantes a ser considerado na biologia dos flebotomíneos é verificar as espécies aptas para transmitirem a infecção ao homem. Informações sobre os hábitos de *Lutzomyia intermedia* têm sido indicadores de capacidade para veicular *Leishmania (V.) braziliensis*. Entretanto, as dificuldades para encontrá-la infectada naturalmente levanta dúvidas sobre essa aptidão, criando obstáculos à sua aceitação como espécie vetora. Assim sendo, este estudo representa tentativa para elucidar essa questão, particularmente no Estado de São Paulo, contribuindo ainda para outras áreas endêmicas brasileiras. Subseqüentemente, um passo a ser considerado seria avaliar natural e experimentalmente sua competência para infecção e transmissão de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Objetivos específicos:

- 1 - Investigar sua infecção natural na mesma área de procedência dos exemplares utilizados no estudo experimental;
- 2 - Testar a suscetibilidade de *L. intermedia* capturados no campo, utilizando-se de hamsters experimentalmente infectados por estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* procedentes de dois diferentes focos naturais;
- 3 - Testar a suscetibilidade de *L. intermedia* criados em laboratório, utilizando-se de hamsters experimentalmente infectados por estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* procedentes de dois diferentes focos naturais;

- 4 - Comprovar a capacidade infectiva para hamsters das promastigotas desenvolvidas em ***L. intermedia***, criados em laboratório, mediante picada;
- 5 - Comprovar a capacidade infectiva para hamsters das promastigotas desenvolvidas em ***L. intermedia*** silvestres, mediante macerados;
- 6 - Estabelecimento de colônia de ***L. intermedia*** para estudo experimental.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - REGIÃO ESTUDADA

A característica geográfica da região do Vale do Ribeira (Forattini *et al.*, 1978) está associada ao conjunto orográfico que domina a paisagem local representada pela Serra do Mar, paredão montanhoso representativo da borda ocidental do planalto cristalino interiorano, que nesse trecho recebe a denominação de Serra de Paranapiacaba. Esta, segue uma direção geral nordeste-sudeste, sendo bastante interiorizada na porção central e situando-se próximo da costa nos extremos. Tal posicionamento possibilita a subdivisão da região em baixada, pré-serrana e encosta.

O clima na baixada é tropical super úmido e, na serra, subtropical super úmido, sujeito a atividade mais acentuada das massas polares.

O aspecto fitogeográfico é caracterizado pela presença da floresta perenofólia higrófila (latifoliada tropical úmida). As sub-regiões pré-serrana e encosta apresentam matas de níveis altos (3 patamares) e, na baixada, matas de níveis baixos (2 patamares).

As alterações introduzidas pelas atividades humanas, no ambiente dominado pelas matas, são mais acentuadas nas localidades da baixada, tendo em vista as maiores dificuldades de acesso e de escoamento oferecidas pelas matas da encosta.

Ainda segundo o autor, o Vale do Ribeira está situado no subcentro de dispersão da Serra do Mar. Esse fato, somado aos conhecimentos a respeito da fauna de vertebrados do país, coloca a região entre as que apresentam grande potencial de endemidade para doenças com focos naturais.

- Área estudada.

A área estudada pertence aos municípios de Miracatu / Pedro de Toledo, situados na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, a 24° 09' de latitude sul e 47° 17' de longitude oeste. Estes municípios são limítrofes e têm topografia acidentada devido aos prolongamentos das ondulações a leste pela Serra de Paranapiacaba e a oeste pela Serra dos Itatins. A zona rural está dispersa entre os vales onde a vegetação primitiva foi substituída pelo cultivo de banana e outras culturas de subsistência.

As habitações estão sempre próximas das culturas ou de resíduos esparsos de vegetação secundária cujos indivíduos arbóreos de maior porte são em número restrito, enquanto que a mata preservada está mais distante (Gomes *et al.*, 1990, 1992).

Os locais escolhidos foram os bairros denominados Pedra do Largo (Distrito Santa Rita) e São Lourencinho que situam-se em um dos enclaves irregulares formados em decorrência da cadeia montanhosa da Serra de Paranapiacaba e está delimitado pelo conjunto de propriedades rurais dispostas ao longo da margem esquerda do rio São Lourencinho (Figuras 1 e 2).

3.2 - COLETA DOS INSETOS

As capturas dos exemplares de flebotomíneos foram realizadas durante os anos de 1994 a 1997, sob condições meteorológicas e estações do ano favoráveis à sua execução, em diversos pontos de coletas nos bairros Pedra do Largo e São Lourencinho (Figura 2).

Os flebotomíneos capturados foram colocados ainda vivos, numa gaiola de manutenção (Rangel *et al.*, 1985) sendo que, após o encerramento dessas atividades, os exemplares foram transportados ao laboratório. Esse dispositivo era envolvido por flanela úmida e acondicionado em saco plástico vedado por fita adesiva, sendo o conjunto colocado em uma caixa de isopor onde uma menor temperatura interna era mantida por blocos de gelo reciclável.

- Métodos de captura

A armadilha de Shannon (1939) foi utilizada para atrair os flebotomíneos (Figura 3) e, com auxílio de um capturador de Castro (Forattini, 1962), capturavam-se todos os exemplares individualmente em horário entre 19 e 24 horas. As capturas foram realizadas em pontos de coleta montados em orla da mata sendo diferenciadas para os testes experimentais e pesquisa de infecção natural. Para esta, entretanto, algumas capturas foram ainda realizadas em domicílios habitados, peridomicílios e interior de mata (Figura 2).

- Identificação dos insetos

O reconhecimento dos espécimens dissecados de *L. intermedia* foi realizado mediante aspecto morfológico das espermatecas, segundo Forattini (1973). Os exemplares machos e aqueles que morreram antes da dissecação, foram identificados segundo alguns elementos considerados no processo clássico de laboratório (Young & Duncan, 1994).

- Distribuição dos insetos capturados

Chegando no laboratório, os insetos foram separados com o auxílio de lupa estereoscópica, de modo a formarem dois grupos:

- fêmeas ingurgitadas, ou com ovos, se destinaram à verificação de infecção natural através da pesquisa de formas flageladas no tubo digestivo.

- fêmeas não ingurgitadas que se destinavam aos experimentos de laboratório. Diversos exemplares desses flebotomíneos foram também utilizados para a formação e manutenção das colônias no laboratório.

3.3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a execução dos objetivos propostos, os exemplares de *Lutzomyia intermedia* foram distribuídos em cinco subgrupos experimentais distintos.

Subgrupo A - PESQUISA DE INFECÇÃO NATURAL EM FLEBOTOMÍNEOS POR PARASITOS DO GÊNERO *Leishmania*

As fêmeas de *Lutzomyia sp.*, ingurgitadas, ou com ovos, foram isoladas individualmente nos tubos de desova. A seguir, eram dissecadas para o

reconhecimento da espécie de *Lutzomyia* mediante análise morfológica da espermoteca, (Forattini, 1973) e pesquisa de formas flageladas no tubo digestivo.

Os exemplares de *L. intermedia* positivos teriam seu conteúdo intestinal inoculado em hamsters não infectados e em meios de cultivo para isolamento e caracterização taxonômica. Após observação da localização dos parasitos ao longo do tubo digestivo dos flebótomos, seriam então , classificados nas seções Peripilária ou Suprapilária.

_ Dissecção dos insetos(Johnson *et al.*,1963) .

Os tubos para desova, contendo as fêmeas a serem dissecadas, eram mantidos no congelador, por um período de cerca de 10 minutos, para a imobilização dos exemplares. A seguir, um exemplar era colocado sobre uma lâmina de microscopia, ao lado de uma gota de salina estéril, e o conjunto visualizado em lupa estereoscópica.

Com o auxílio de um estilete de ponta recurvada em ângulo de 90° , a cabeça do inseto era fixada contra a lâmina e, com outro estilete, pressionava-se levemente o penúltimo segmento do abdômen, retesando-o delicadamente em direção ao centro da gota de salina, de modo a extrair o estômago anterior e posterior, intestinos e túbulos de Malpighi.

O conjunto era arranjado sobre a lâmina, de modo que, do proventrículo à ampola retal fossem claramente visíveis. A seguir, era coberto com lamínula sendo a preparação observada sob microscopia comum e aumento de 400 vezes.

Subgrupo B - TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE *Lutzomyia intermedia* CAPTURADOS NO CAMPO PARA ESTIRPES DE *Leishmania (V.) braziliensis*, UTILIZANDO-SE DE HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS (Rangel et al., 1985).

Uma amostra composta por 100 exemplares fêmeas de *L. intermedia* capturados no campo, dividida em lotes de 10 exemplares, foi colocada em contato com hamsters experimentalmente infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*. Este procedimento foi realizado com as estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*: MHOM/BR/75/M2903 e MCAN/BR/82/7312.

À população de cada lote era servido, uma única vez, um hamster experimentalmente infectado. Este, previamente anestesiado, imobilizado em envelope de tela de arame com o ventre voltado para cima, e colocado em uma tampa de placa de petri forrada com papel de filtro, era introduzido na gaiola de manutenção por um período de, aproximadamente, 12 horas.

A seguir, as fêmeas ingurgitadas eram separadas individualmente nos tubos de desova e os respectivos substratos umedecidos com água destilada. No orifício central das tampas era colocada uma bolinha de algodão embebida em solução açucarada, a qual era trocada diariamente.

Os tubos de desova eram colocados em estante de arame e acondicionados em caixa plástica opaca forrada com gesso umedecido e tampada, e assim, eram mantidas por 07 dias à temperatura aproximada de 25°C. Após esse período, eram dissecadas para o reconhecimento da espécie de *Lutzomyia*, mediante análise morfológica da espermateca (Forattini, 1973) e pesquisa de formas flageladas no tubo digestivo.

As preparações coincidentes com a espécie *L. intermedia* e que apresentavam formas flageladas, eram então destinadas aos experimentos do Subgrupo E.

Subgrupo C - TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE *Lutzomyia intermedia* CRIADOS EM LABORATÓRIO PARA ESTIRPES DE *Leishmania (V.) braziliensis*, UTILIZANDO-SE DE HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS (Rangel *et al.*, 1985).

Uma amostra composta por 100 exemplares fêmeas de *L. intermedia*, com 02 a 03 dias de idade, em jejum, dividida em lotes de 10 exemplares, foi colocada em contato com hamsters experimentalmente infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*. Este procedimento foi realizado com as estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 e MCAN/BR/82/7312.

O procedimento de alimentação nos hamsters e de tratamento das fêmeas ingurgitadas foi semelhante ao aplicado no subgrupo B. Após 07 dias, aos exemplares que se ingurgitaram, foi dado o seguinte direcionamento:

- C₁ - 50% dos exemplares ingurgitados foram dissecados para a pesquisa de promastigotas em seus tubos digestivos.
- C₂ - 50% dos exemplares ingurgitados se destinaram à testes da capacidade infectiva das promastigotas "via picada" (Subgrupo D).

Subgrupo D - TESTE DA CAPACIDADE INFECTIVA DAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (V.) braziliensis* DESENVOLVIDAS EM *Lutzomyia intermedia* COLONIZADOS, PARA HAMSTERS NÃO INFECTADOS, MEDIANTE “PICADA” (Lawyer & Young, 1987).

Este teste foi composto por 50% (C₂) dos exemplares de *L. intermedia* que ingurgitaram nos experimentos do Subgrupo C, quando eram colocados novamente em contato com hamsters não infectados para se tentar um novo repasto sanguíneo. Este procedimento foi realizado com as estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 e MCAN/BR/82/7312.

Os exemplares de *L. intermedia* (C₂), que ingurgitaram em hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania (V.) braziliensis*, eram recolocados individualmente nos tubos de desova e mantidos adequadamente por 07 dias. Após esse período, os exemplares sobreviventes eram colocados em contato com hamster não infectado, tendo apenas suas patas traseiras expostas, para que fosse tentado um novo repasto sanguíneo. Os exemplares que o realizaram foram dissecados para confirmação da presença de formas flageladas em seus tubos digestivos.

Aos exemplares que não se realimentavam nesta oportunidade era servido, diariamente, hamsters não infectados até que o ingurgitamento ou morte acontecesse. Após isto, também foram dissecados com o mesmo objetivo.

Os hamsters picados pelos flebotomíneos foram monitorados para a detecção de qualquer sinal de lesão leishmaniótica, por um período de até 04 meses (Coelho & Falcão, 1962a). Após completar o período de observação, o animal era sacrificado e a pesquisa dos parasitos realizada no fígado e baço, mediante esfregaços submetidos ao método de coloração de Giemsa e cultivos em meio NNN.

Subgrupo E - TESTE DA CAPACIDADE INFECTIVA DAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (V.) braziliensis* DESENVOLVIDAS EM *Lutzomyia intermedia* SILVESTRES, PARA HAMSTERS NÃO INFECTADOS, MEDIANTE "MACERADOS".

Este grupo foi composto pelos exemplares fêmeas de *L. intermedia* capturadas no campo e que se infectaram nos experimentos do Subgrupo B.

Os insetos dissecados oriundos de cada lote estudado, coincidentes com a espécie *L. intermedia* e que se infectaram experimentalmente, tinham o conteúdo intestinal dilacerado, com o auxílio de uma seringa tipo tuberculina e agulha calibre 13x4,5. A seguir, o conteúdo de uma ou duas preparações, por lotes examinados, era aspirado e inoculado, via intradérmica, nas patas traseiras de um hamster não infectado.

Os hamsters inoculados com esses macerados foram monitorados para a detecção de lesões leishmanióticas, por um período de até 04 meses (Coelho *et al.*, 1967b). Após completar o período de observação, o animal com ou sem lesão aparente, era sacrificado e a pesquisa dos parasitos realizada nas lesões externas, baço e fígado, mediante esfregaços submetidos ao método de coloração de Giemsa e cultivos em meio NNN. Este procedimento foi realizado com as estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 e MCAN/BR/82/7312.

3.4 - CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos propostos foram realizados em ambiente com temperatura a 25°C e umidade relativa de 85%, segundo Rangel *et al.* (1985).

3.5 - MODELO ESTATÍSTICO

Foi utilizado o X^2 para análise comparativa dos resultados (Berquó *et al.*, 1981)

3.6 - ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA , EM LABORATÓRIO , DE *Lutzomyia intermedia* (Rangel *et al.*, 1985 ; Wermelinger *et al.*, 1987).

O papel dos flebotomíneos (gêneros: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) como disseminadores e transmissores de Leishmaniose e Bartolense há muito foi estabelecido. Entretanto, o conhecimento sobre a biologia desses insetos ainda é escasso, principalmente devido às dificuldades encontradas para identificar hábitos silvestres e colonizá-los com propósitos experimentais.

Estudos como infecções experimentais para testes de suscetibilidade, ciclo de vida das leishmanias e testes de transmissão; xenodiagnósticos em humanos ou animais infectados; biologia, fisiologia e comportamento; genética e estratégias de controle populacional necessitam, para o seu desenvolvimento, de um grande número de exemplares que são obtidos mediante sua colonização em laboratório.

Os resultados obtidos, relativos à produtividade dessas colônias, embora fossem satisfatórios, fizeram com que os autores admitissem a necessidade de se introduzir modificações específicas nas metodologias para acomodar peculiaridades particulares das espécies colonizáveis, não obstante a inexistência

de procedimento único para se obter sucesso quanto aos gêneros ***Phlebotomus*** e ***Lutzomyia*** (Hertig & Johnson, 1961; Chaniotis, 1975; Gemetchu, 1976; Ward, 1977; Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Modi & Tesh, 1983; Rangel *et al.*, 1985).

No Brasil, as primeiras colônias de flebotomíneos foram estabelecidas com o propósito de conhecer aspectos biológicos desses insetos e, envolveram inicialmente, as espécies ***L. whitmani*** (Barretto, 1941), ***L. longipalpis*** (Chagas, 1940) e ***L. intermedia*** (Bayma, 1936; Barretto, 1940; Chagas, 1940) às quais se atribuíam papéis relevantes na transmissão da leishmaniose em diversas regiões do país. Com relação à espécie ***L. intermedia***, os estudos mais recentes foram desenvolvidos por Rangel *et al.* (1985) e Wermelinger *et al.* (1987) que com o intuito de ampliar os conhecimentos da biologia dessa espécie, estabeleceram uma colônia produtiva a partir de exemplares capturados no Estado de Rio de Janeiro.

Para que fosse possível operacionalizar a metodologia proposta no presente trabalho, pensou-se a princípio, que seria possível estabelecer uma única colônia produtiva que fornecesse todos os exemplares necessários ao estudo. Este pensamento foi assentado a partir de estágios realizados no Instituto Oswaldo Cruz e no Instituto Evandro Chagas e, posteriormente, a um relativo sucesso nas primeiras experiências voltadas à colonização. Entretanto, no decorrer de meses, apesar de todos os esforços dispendidos, verificou-se que uma única colônia não seria produtiva o suficiente para fornecer os exemplares necessários aos experimentos.

A constatação da dificuldade em se estabelecer uma única colônia de ***L. intermedia*** e, subsidiado pela metodologia desenvolvida em Jaramillo *et al.* (1994), na qual utilizaram exemplares de primeira geração para experimentos de suscetibilidade com espécies de ***Lutzomyia*** neotropicais, optou-se por uniformizar e

desenvolver todos os procedimentos, também a partir de exemplares obtidos das primeiras gerações.

3.6.1 - Estágio adulto

No laboratório, para o repasto sanguíneo dos insetos capturados no campo, era servido um hamster não infectado, por um período aproximado de 12 horas.

A seguir, as fêmeas ingurgitadas eram separadas individualmente em tubos de desova. Os respectivos substratos eram umedecidos com água destilada e, no orifício central das tampas era colocada uma bolinha de algodão embebida em solução açucarada, a qual era trocada 03 vezes por semana.

Os tubos de desova eram colocados em estante de arame, acondicionados em caixa plástica forrada com gesso umedecido e tampada, e assim, mantidas até a postura da fêmeas. Diariamente eram observados para o controle da umidade e presença de ovos.

Após a desova, as fêmeas eram dissecadas, identificadas mediante análise morfológica da espermateca, segundo Forattini (1973) e, os exemplares da espécie *L. intermedia*, tinham seus ovos transferidos para os potes de criação. As gerações subsequentes não eram mais submetidas ao processo de identificação.

3.6.2 - Estágio larvário

Com auxílio de um pincel, os ovos eram retirados dos substratos dos tubos de desova e transferidos para um pote de criação (cerca de 200 ovos/pote),

previamente umedecido com solução anti-fúngica. A seguir, este tubo era tampado e acondicionado em caixa plástica forrada com gesso, igualmente umedecida, tampada e datada.

Cinco dias após, era espalhado pequena quantidade de ração larvária no interior do pote, sendo esta trocada 03 vezes por semana, durante todo o desenvolvimento larvário.

Ao iniciar a formação das pupas, as tampas dos potes eram retiradas e substituídas por nylon organdi, sendo fixado nas bordas dos potes com halo elástico retirado da tampa do pote. O tecido tinha uma fissura central para facilitar a retirada dos insetos emergentes, sendo mantida obliterada por chumaço de algodão.

Na superfície lateral do tecido foi colocado um outro chumaço de algodão embebido com solução açucarada, destinada a alimentar os insetos retardatários

À medida que os insetos emergiam, estes eram retirados dos potes com o auxílio do capturador de Castro, e transferidos para gaiola de manutenção. Após a emergência da maioria dos insetos, era então servido um hamster são por período aproximado de 12 horas, para o repasto sanguíneo das fêmeas. Estas, após ingurgitamento, eram separadas individualmente nos tubos de desova, reiniciando o ciclo de criação.

A proliferação de fungos, nos potes de criação, requereu atenção permanente, durante todo o desenvolvimento larvário, e o controle da umidade, durante todo o processo de criação dos insetos.

3.6.3 - Gaiolas de manutenção

Eram utilizadas para o transporte, alimentação e acasalamento dos insetos adultos. Consistia de um saco de 18 cm³, confeccionado com nylon organdi de cor branca, permanecendo preso e suspenso (dentro de uma estrutura oca, retangular de 25 cm³, construída com haste de alumínio), mediante amarração nos seus oito cantos (Figura 4).

A umidade interna era mantida envolvendo a gaiola com uma flanela umedecida e acondicionada dentro de um saco plástico vedado com fita adesiva (Rangel *et al.*, 1985).

3.6.4 - Tubos de polietileno

Eram utilizados para o isolamento e desova das fêmeas. Consistiam de tubos de polietileno com 04 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro (Figura 4). Eram montados, colocando no fundo uma rodela e, sobre esta, uma pequena sanfona, ambas de papel de filtro, que funcionavam como substrato. A porção superior era fechada por um pedaço de nylon de organdi, preso por uma tampa de plástico, tendo nesta um pequeno orifício central (Rangel *et al.*, 1985).

3.6.5. - Solução açucarada

Semanalmente, era preparada uma solução a 50% de açúcar refinado e água destilada. (Yarbu & Scorza, 1982)

3.6.6 - Potes de criação

Destinavam-se ao desenvolvimento dos estágios larvários. Consistiam de potes plásticos medindo 08 cm de altura e 15 cm de diâmetro, forrados com gesso, tanto no fundo quanto na lateral (Figura 4). Como tampa, foi utilizado um prato plástico de vaso xaxim, igualmente forrado com gesso (Wermelinger *et al.*, 1987).

3.6.7 - Solução anti-fúngica

Foi preparada diluindo-se 02 gotas de anti-fúngico, usado em aquário para peixes, em 01 litro de água destilada estéril. Esta solução era preparada semanalmente (Wermelinger *et al.*, 1987).

3.6.8 - Ração larvária

Utilizado para a alimentação das larvas. Era constituída por ração para peixes "Vitormônio", suplemento nutricional de aminoácidos "Amino Power Plus", pólen dessecado e fígado dessecado.

Os componentes eram triturados em igual proporção, misturados, distribuídos em pequenos frascos e esterilizados por autoclavação a 120°C por 30 minutos.

3.7 - UTILIZAÇÃO DE HAMSTERS COMO FONTE ALIMENTAR SANGUÍNEA DISPONÍVEL PARA OS INGURGITAMENTOS.

O repasto sanguíneo para os testes de suscetibilidade pode ser realizado sobre animais experimentalmente ou naturalmente infectados, em lesões de casos humanos ou mediante alimentadores artificiais tipo membrana ou capilar. Assim, esses índices de positividade decorrentes de um ou outro modo de alimentação são também variáveis.

O alimentador artificial tipo membrana é de uso relativamente freqüente em alguns laboratórios de pesquisa uma vez que possibilita trabalhar com uma determinada concentração de formas evolutivas de *Leishmania* na solução diluidora, permite recuperar a infectividade de leishmanias por nova passagem em flebotomíneos e, infectar insetos que se recusem a alimentar em animais infectados (Ward *et al.*, 1978).

Para a maioria dos laboratórios o uso deste tipo de alimentador é, entretanto, de uso restrito devido a dificuldade de se obter e manusear a membrana, extraída principalmente, de pele de peito de pinto com três dias de idade; pela possibilidade de deposição das hemácias e formas evolutivas do protozoário no fundo do recipiente utilizado como reservatório, diminuindo o índice de positividade (Bastien, 1992) e, pela aparelhagem de manuseio relativamente complexa.

O alimentador artificial tipo capilar, idealizado por Hertig & Hertig (1927) e tido como eficiente por Napier (1930) e Adler & Teodor (1957) serviu como aparato alimentador nos trabalhos de Hertig & McConnel (1963) e Warburg & Schlein (1986). Embora a literatura apresente índices elevados de positividade com relação a este alimentador, o requerimento de uma perícia peculiar no manuseio de

flebotomíneo para introduzir a probóscida no tubo capilar sem danificá-lo e, o teste de infectividade ser realizado isoladamente para cada inseto, constituem os óbices para uma utilização mais ampla deste tipo de alimentador.

Os índices de positividade, mediante a utilização de animais de grande porte como primatas e cães, experimentalmente ou naturalmente infectados, para a realização do repasto sanguíneo, tem sido pouco expressivos. Entretanto, sendo animais que demandam um manuseio e estocagem de maior complexidade, há dificuldade em utilizá-los frequentemente com propósitos experimentais (Pessoa & Coutinho, 1941; Vexenat *et al.*, 1986).

A ampla utilização de hamsters experimentalmente infectados com diferentes espécies de *Leishmania* deveu-se, principalmente, à verificação de que esses animais apresentavam grande suscetibilidade a esses protozoários com lesões nos pontos de inoculação (Coelho & Falcão, 1962; Coelho & Coutinho-Abath, 1965; Wilson *et al.*, 1979), sendo fáceis de manusear, além de se poder acomodá-los em grande número nos biotérios, tanto como inoculados quanto de reserva.

A maioria dos trabalhos de suscetibilidade de flebotomíneos frente a diferentes espécies de *Leishmania*, utilizaram esses pequenos animais como fonte de alimentação sanguínea permitindo em geral, que apenas a área ulcerada fosse exposta para o ato do repasto sanguíneo. Os percentuais obtidos, à semelhança da utilização de outras fontes sanguíneas, são variáveis em função de fatores não totalmente conhecidos conforme exemplificados nos trabalhos de Barretto *et al.* (1986) e Jaramillo *et al.* (1994).

No nosso trabalho, após análise da literatura sobre o tema e das condições materiais disponíveis para a realização dos experimentos, optamos pela utilização de hamsters como fonte alimentar sanguínea dos flebotomíneos.

3.8 - UTILIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE *Leishmania (V.) braziliensis* CONFORME ESPECIFICIDADE FLEBOTOMÍNEO / *Leishmania*.

Os flebotomíneos neotropicais exibem, significativamente, maior aptidão em suas suscetibilidades frente a uma determinada espécie de *Leishmania*, suportando o completo desenvolvimento do protozoário mesmo em associações consideradas como não naturais (Walters *et al.*, 1993). Esta, entendida como artificial uma vez que resulta de escolha aleatória da espécie por parte do pesquisador.

A maior aptidão dos espécimens neotropicais foi primeiramente demonstrada por Hertig & McConnell (1963) em trabalho com diversas estirpes de *L. braziliensis* s. lat. panamenhas. Todas as estirpes desenvolveram-se completamente em *L. sanguinaria*, *L. gomezi*, *L. panamensis*, *L. trapidoi* e, em *L. ylephiletor*, consideradas as cinco espécies de flebotótomos mais antropofílicos comumente encontradas nas florestas do país.

Coelho (1964) realizou experimentos com *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* hondurenha, com *Leishmania* do complexo *mexicana* isolada de quadro clínico compatível com leishmaniose nodular difusa na Bahia (BR) e, com duas estirpes de *Leishmania tropica* israelense. Todas as amostras desses parasitos desenvolveram-se em *L. longipalpis* e *L. renei*, espécies que não ocorriam em áreas onde os parasitos foram isolados. Posteriormente, Coelho *et al.* (1967) relataram que a amostra “Bahia” desenvolveu em oito espécies de *Lutzomyia*: *L. intermedia*, *L. whitmani*, *L. sallesi*, *L. shannoni*, *L. arthuri*, *L. monticola* e *L. cavernicola*.

Killick-Kendrick *et al.* (1977, 1977a), relataram o desenvolvimento completo de leishmanias dos complexos **mexicana** e **braziliensis** em **L. longipalpis** e, Lainson *et al.* (1979), observaram desenvolvimento de **Leishmania peruviana**, **Leishmania tropica** e **Leishmania major** na mesma espécie de flebótomo.

Com relação à **L. intermedia**, os resultados obtidos por Chagas (1940), Coelho *et al.* (1967) e Rangel *et al.* (1992, 1993) confirmam a suscetibilidade desse flebotomíneo frente a diferentes espécies de leishmanias como **Leishmania chagasi**, **Leishmania braziliensis**, **Leishmania guyanensis**, **Leishmania panamensis** e **Leishmania** complexo **mexicana**.

A literatura disponível sobre leishmaniose no Vale do Ribeira assinala a espécie **L. braziliensis, s. lat.** como a de maior circulação na área como também a presença, em grande densidade, de **L. intermedia**. Assim, aliado a relatos de infecções experimentais com **L. intermedia** frente a diferentes espécies desse parasito de outras áreas geográficas pôde-se, em decorrência, admitir que também para o Vale do Ribeira, **L. intermedia** seria suscetível à **Leishmania** de maior circulação.

No nosso trabalho, mesmo reconhecendo as variabilidades na infecção de flebotomíneos, optamos por utilizar duas estirpes de **Leishmania (V.) braziliensis** procedentes da área de estudo, no Vale do Ribeira, e outra da região amazonense, para assegurar análise mais consistente.

3.9 - MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES ORIGINAIS DE *Leishmania (V.) braziliensis*

“IN VITRO”

As estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 da região amazônica e MCAN/BR/82/7312 do Vale do Ribeira, utilizadas para infectar experimentalmente os primeiros hamsters, eram mantidas em cultivo a 24°C, em meio de NNN (Walton *et al.*, 1977), suplementado com Schneider's *Drosophila* medium (Hendricks & Wright, 1979), 20% de soro fetal bovino inativado (Beach *et al.*, 1984), penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (200 mg/ml), sendo repicado semanalmente (Figura 5). Esses cultivos foram desativados devido à contaminação fúngica.

3.10 - CULTIVO DE *Leishmania*

As formas flageladas ocasionalmente detectadas em *Lutzomyia* silvestres e, as não flageladas, detectadas em extratos de baço e fígado daqueles hamsters infectados mediante picada ou por macerados, foram colocadas em meios de cultivo NNN (Walton *et al.* 1977) e mantidos em estufa a 24°C até a constatação do não desenvolvimento de formas evolutivas ou contaminação do meio utilizado.

As formas flageladas de exemplares silvestres, seriam ainda inoculadas em hamsters não infectados tanto para a manutenção da estirpe isolada como para seu posterior estudo taxonômico.

3.11 - MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES DE *Leishmania (V.) braziliensis* "IN VIVO"

Os hamsters infectados com as estirpes originais de *Leishmania*, foram mantidos isolados em gaiolas e ambiente apropriado até que as lesões nos locais de inoculação estivessem visíveis, sem entretanto, constituírem grandes histiocitomas (Figura 6). A partir daí, cada hamster era sacrificado após períodos de aproximadamente 60 dias. Após ser retirado da lesão um fragmento de tecido, este era macerado em salina 0,85% estéril, sendo 0,2 ml do extrato inoculado em cada pata de um novo hamster (Wilson *et al.*, 1979), conforme procedimento técnico recomendado por Chase (1967). Desta maneira, manteve-se um estoque de hamsters infectados, de modo a suprir as necessidades dos experimentos.

Os hamsters que se destinavam aos testes de capacidade infectiva, testes de suscetibilidade e à alimentação dos insetos colonizados, eram previamente anestesiados, via intraperitoneal, com 0,25 ml de thionembutal. Este, era preparado diluindo 1,0g do reagente em 50 ml de solução salina estéril (0.85% NaCl) (Rangel *et al.*, 1985).

RESUMO DO MODELO EXPERIMENTAL

- SUBGRUPO A** - Pesquisa da infecção natural (Fêmeas de campo)
- Taxa de positividade
- SUBGRUPO B** - Medida da suscetibilidade (Fêmeas de campo)
- Taxa de alimentação no animal infectado
 (10 lotes de 10 fêmeas de flebotomíneo)
- Taxa de positividade
- Fêmeas infectadas → **SUBGRUPO E**
- SUBGRUPO C** - Medida da suscetibilidade (Fêmeas de laboratório)
- Taxa de alimentação no animal infectado
 (10 lotes de 10 fêmeas de flebotomíneo)
- Taxa de positividade
- 50% fêmeas ingurgitadas → **SUBGRUPO D**
- SUBGRUPO D** - Medida da capacidade infectiva da Promastigota “via picada”
- Taxa de realimentados
- Taxa de realimentados infectados
- Taxa de hamster infectado
- SUBGRUPO E** - Medida da capacidade infectiva da Promastigota “via macerado”
- Taxa de hamster infectado

Figura 1.

* Localização da área de estudo no Estado de São Paulo e sua divisão municipal

Figura 2.

Figura 3.

- Barraca de Shannon -

- Canturador de Castro -

Figura 4.

1. Gaiola para manutenção e transporte dos insetos
2. Pote com gesso para desenvolvimento larvário
3. Pote para oviposição das fêmeas
4. Tela de arame para imobilização dos hamsters

Figura 5.

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*
em cultivo acelular

Figura 6.

Histiocitoma em hamster por inoculação
experimental de *L. (V.) braziliensis*

4 - RESULTADOS

4.1 - Número total de flebotomíneos silvestres capturados e dissecados para pesquisa de infecção natural por ***Leishmania*** no Vale do Ribeira , Estado de São Paulo .

Na Tabela 1, observamos uma acentuada predominância da espécie ***L. intermedia*** (95,2%) sobre as demais capturadas, tendo sido obtido o maior número de exemplares nos pontos de coletas situados na orla da mata.

Na Tabela 2, verificamos ser alta a porcentagem de fêmeas de ***L. intermedia*** dissecadas (97,1%) no período estudado. Apesar disso, não foram detectadas formas flageladas nesses exemplares ou mesmo nos exemplares das outras espécies.

Tabela 1. Número de flebotomíneos silvestres capturados em orla de mata e peridomicílios segundo sexo, no período de 1994 a 1997.

Espécie	Sexo		Total
	Fêmea	Macho	
<i>L. intermedia</i>	6.751	616	7.367
<i>L. fischeri</i>	200	4	204
<i>L. migonei</i>	11	11	22
<i>L. ayrozai</i>	119	21	140
Total	7.081	652	7.733

Tabela 2. Número de fêmeas silvestres dissecadas para determinação de infecção natural por *Leishmania* segundo espécies de flebotomíneos, no período período de 1994 a 1997.

Espécie	Número	%
<i>L. intermedia</i>	5.291	97,1
<i>L. fischeri</i>	93	1,7
<i>L. migonei</i>	2	0,0
<i>L. ayrozai</i>	62	1,1
Total	5.448	99,9

4.2. Distribuição das estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* em *Lutzomyia intermedia*

Na Tabela 3, observamos que 238 exemplares de *L. intermedia* (silvestres e colonizados) se infectaram com as 02 estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*, M 2903 e 7312 . Destes, 117 exemplares corresponderam à estirpe M 2903 e 121 à estirpe 7312.

Aplicando-se o Teste do qui-quadrado (X^2) sobre a relação estirpe M2903 / *L. intermedia* (silvestres e colonizados) e estirpe 7312 / *L. intermedia* (silvestres e colonizados), verificamos que as duas proporções observadas são significativamente iguais às esperadas, demonstrando que a capacidade infectiva de *Leishmania(V.) braziliensis* M 2903 é, em igual proporção, tanto para *L. intermedia* silvestres como colonizados, o mesmo ocorrendo com a estirpe 7312.

Tabela 3. Resultado global dos testes de suscetibilidade para as estirpes de ***Leishmania(V.) braziliensis*** segundo procedência de ***Lutzomyia intermedia***: silvestres e colonizados.

<i>L.</i> <i>intermedia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>					
	■ M 2903		■ 7312		Total	
	Infecciosidade		Infecciosidade		Infecciosidade	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Silvestres	64	20	59	23	123	43
Colonizados	53	26	62	23	115	49
Total	117	46	121	46	238	92

$\chi_e^2 = 1,664$ (p < 0,05) ■ MHOM/BR/75/M2903

$\chi_e^2 = 0,020$ (p < 0,05) ■ MCAN/BR/82/7312

4.2.1 - Frequência de *Lutzomyia intermedia* silvestres e experimentalmente infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*

Após a seleção das fêmeas capturadas no campo e ingurgitadas em hamsters experimentalmente infectados com 02 diferentes estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*, observamos que de 166 exemplares dissecados, foram encontrados 64 infectados (76%) no experimento com a estirpe M 2903 e 59 exemplares infectados (72%) com a estirpe 7312 (Tabela 4).

Aplicando-se o Teste do qui-quadrado (X^2) verificamos que as proporções observadas são significativamente iguais às esperadas, demonstrando que *L. intermedia* silvestres foram suscetíveis em iguais proporções em relação às estirpes M 2903 e 7312.

Tabela 4. Número e percentual de *Lutzomyia intermedia* silvestres experimentalmer infectados segundo estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*

Estirpes de <i>L. (V.) braziliensis</i>	Fêmeas de <i>L. intermedia</i> silvestres				% de positividade
	nº de expostos	nº de dissecados	nº de infectados	nº de não infectados	
■	100	84	64	20	76,1
■	100	82	59	23	72,0
Total	200	166	123	43	74,0

$\chi_e^2 = 0,389$ (p < 0,05)

- MHOM/BR/75/M2903
- MCAN/BR/82/7312

Na Figura 7 é demonstrado o número de fêmeas silvestres que se infectou, dentro de cada lote composto por 10 exemplares. Podemos observar que a estirpe M 2903 desenvolveu em um máximo de 09 exemplares apenas em 01 desses lotes e, em um mínimo de 05 exemplares nos lotes 4 , 7 , 8 e 9.

Para a estirpe 7312, o número máximo foi de 08 exemplares infectados igualmente em 01 único lote e, em um número mínimo de 05 exemplares nos lotes 1, 6, 8 e 10, demonstrando assim, espectros similares de suscetibilidade de *L. intermedia* silvestres frente a 02 estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis* dentro desses lotes examinados.

Figura 7. Número de exemplares de *Lutzomyia intermedia* silvestres suscetíveis a *Leishmania(V.) braziliensis* segundo 10 lotes examinados.

Legenda:

- Estirpe MHOM/BR/75/M2903
 - Estirpe MCAN/BR/82/7312
- Um lote = 10 fêmeas

4.2.2 - Frequência de *Lutzomyia intermedia* colonizados e experimentalmente infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*

Após ingurgitamento das fêmeas colonizadas em hamsters experimentalmente infectados com 02 diferentes estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*, observamos que de 164 exemplares dissecados, foram encontrados 53 infectados (67%) no experimento com a estirpe M 2903 e 62 exemplares infectados (73%) com a estirpe 7312 (Tabela 5).

Aplicando-se o Teste do qui-quadrado (X^2) verificamos que as proporções observadas são significativamente iguais às esperadas, demonstrando que *L. intermedia* colonizados foram suscetíveis em iguais proporções em relação às estirpes M 2903 e 7312.

Tabela 5. Número e percentual de *Lutzomyia intermedia* colonizados, experimentalmente infectados, segundo estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L. (V.) braziliensis</i>	Fêmeas de <i>L. intermedia</i> colonizadas				%
	nº de expostos	nº de dissecados	nº de infectados	nº de não infectados	
■	100	79	53	26	67,0
■	100	85	62	23	73,0
Total	200	164	115	49	70,1

$\chi_e^2 = 0,615$ (p < 0,05)

■ MHOM/BR/75/M2903

■ MCAN/BR/82/7312

Na Figura 8 é demonstrado o número de fêmeas colonizadas que se infectou, dentro de cada lote composto por 10 exemplares. Podemos observar que a estirpe M 2903 desenvolveu em um máximo de 07 exemplares em 02 desses lotes e em um mínimo de 04 exemplares nos lotes 3, 8 e 9.

Para a estirpe 7312, o número máximo foi de 09 exemplares infectados em 01 único lote seguido de 08 exemplares em outros 02 lotes e, de um mínimo de 04 exemplares nos lotes 2, 5 e 9, demonstrando assim que ***L. intermedia*** colonizado infectou em maior proporção com a estirpe de ***Leishmania (V.) braziliensis*** originária do Vale do Ribeira, dentro desses lotes examinados.

Figura 8. Número de exemplares de *Lutzomyia intermedia* colonizados suscetíveis a *Leishmania (V.) braziliensis* segundo 10 lotes examinados.

Legenda:

- Estirpe MHOM/BR/75/M2903
 - Estirpe MCAN/BR/82/7312
- Um lote = 10 fêmeas

4.3 - Frequência de hamsters infectados, via picada, por *Lutzomyia intermedia* colonizados

Na Tabela 6, observamos que para os experimentos via picada, 39 fêmeas foram expostas à uma segunda alimentação em hamsters não infectados. Dos 03 exemplares que se realimentaram, 02 estavam infectados com a estirpe M 2903, não sendo verificado nenhum hamster contaminado.

Para o segundo experimento, 43 fêmeas foram expostas com o mesmo propósito. Dos 02 exemplares que se realimentaram, 01 estava infectado com a estirpe 7312, não sendo verificado infectividade no hamster.

Tabela 6. Resultados das infecções de hamsters, via picada, de *Lutzomyia intermedia* colonizados segundo estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L.(V.) braziliensis</i>	Fêmeas de <i>L. intermedia</i> colonizadas			Nº de hamsters que se infectaram
	nº de expostos à realimentação	nº de realimentados	nº de realimentados infectados	
■	39	3	2	0
■	43	2	1	0
Total	82	5	3	0

■ MHOM/BR/75/M2903

■ MCAN/BR/82/7312

4.4 - Comprovação do poder infectivo de *Leishmania (V.) braziliensis* com promastigotas de *Lutzomyia intermedia* silvestres, via macerado.

Na Tabela 7, observamos que de 35 hamsters limpos expostos à macerados de *L. intermedia* infectados com a estirpe M 2903, 20 se infectaram. Em outro experimento, 32 hamsters não infectados expostos à macerados de exemplares com a estirpe 7312, 22 deles se infectaram.

Aplicando-se o Teste do qui-quadrado (X^2) verificamos que as proporções observadas são significativamente iguais às esperadas, demonstrando que as estirpes M 2903 e 7312 desenvolvidas em *L. intermedia* silvestres infectaram, via macerado, hamsters em iguais proporções.

Tabela 7. Número e percentual de hamsters infectados por macerados de *Lutzomyia intermedia* silvestres infectados segundo estirpes de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Estirpes de <i>L.(V.) braziliensis</i>	Hamsters			%
	nº de expostos	nº de infectados	nº de não infectados	
■	35	20	15	57,1
■	32	22	10	68,7
Total	67	42	25	62,6

$\chi_e^2 = 0,921$ (p < 0,05)

■ MHOM/BR/75/M2903

■ MCAN/BR/82/7312

4.5. Colonização de *Lutzomyia intermedia* do Vale do Ribeira.

Na Tabela 8, observamos o número de elementos obtidos para as 10 colônias de *L. intermedia* referentes às diversas fases do ciclo de criação na primeira geração. A partir de 2.192 ovos, obteve-se um total de 267 exemplares machos e 265 fêmeas, correspondendo a um rendimento de 24,3%; 41,6% e 92,4% a partir de ovos, larvas e pupas, respectivamente, demonstrando assim, a viabilidade de colonização dessa espécie de flebotomíneo para fins experimentais.

Tabela 8. Resultado da criação de *Lutzomyia intermedia* em laboratório. Primeira geração: total de adultos alados obtidos a 25°C e 85% de umidade relativa.

Colônia	ovos de fêmeas	Larvas				Pupas	Adultos – G ₁	
	silvestres	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄		M	F
1	246	157	89	78	73	38	33	
2	226	131	95	64	63	25	27	
3	152	85	67	48	42	18	22	
4	263	168	95	66	65	30	31	
5	230	127	103	51	50	25	21	
6	232	150	82	73	69	35	32	
7	228	128	100	60	55	23	24	
8	242	133	109	60	58	25	28	
9	173	88	85	48	45	20	22	
10	200	112	88	58	56	28	25	
Total	2.192	1.279	913	606	576	267	265	

Nas Tabelas 9 e 10, são igualmente demonstrados o número de formas imaturas obtidas nas diversas fases do ciclo de criação somente para a segunda geração das colônias 1, 4 e 6 e, terceira geração das colônias 4 e 6, uma vez que as demais colônias não desenvolveram além da primeira geração.

Para a segunda geração, a partir de 289 ovos, foram obtidos 36 exemplares machos e 37 fêmeas, correspondendo a um rendimento de 25,3%, 38,0% e 83,0% a partir de ovos, larvas e pupas, respectivamente.

Para a terceira geração, a partir de 171 ovos, foram obtidos 16 exemplares machos e 16 fêmeas, correspondendo a um rendimento de 18,7%, 28,0% e 74,4% a partir de ovos, larvas e pupas, respectivamente.

Tabela 9. Resultado da criação de *Lutzomyia.intermedia* em laboratório. Segunda geração: total de adultos alados obtidos a 25°C e 85% de umidade relativa.

Colônia	ovos de fêmeas	Larvas				Pupas	Adultos – G ₂	
		G ₁	L ₁	L ₂	L ₃		L ₄	M
1	62	25	10	8	6	2	3	
4	104	75	40	36	35	13	10	
6	123	92	51	50	47	21	24	
Total	289	192	101	94	88	36	37	

Tabela 10. Resultado da criação de *Lutzomyia intermedia* em laboratório. Terceira geração: total de adultos alados obtidos a 25°C e 85% de umidade relativa.

Colônia ovos de fêmeas		Larvas				Pupas	Adultos – G ₃	
	G ₂	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄		M	F
4	71	41	19		12	12	4	5
6	100	73	42		32	31	12	11
Total	171	114	61		44	43	16	16

Na Tabela 11, observamos que na primeira geração, 125 fêmeas (47%) ovipuseram, obtendo-se 01 fêmea com máximo de 46 ovos e, a maioria delas (64 fêmeas) com número que variaram entre 16 a 30 ovos por desova, correspondendo à média geral de 17,5 ovos / fêmea.

Para a segunda geração, somente 15 fêmeas ovipuseram, obtendo-se 02 fêmeas com máximo de 41 a 45 ovos e 01 fêmea com mínimo de 03 ovos, correspondendo à média geral de 19,2 ovos / fêmea. Para a terceira geração, 10 fêmeas (62%) desovaram, obtendo-se 01 fêmea com máximo de 32 ovos, correspondendo à média geral de 17,1 ovos / fêmea.

Tabela 11. Resultado da criação de *Lutzomyia intermedia* em laboratório. Distribuição do número de ovos por desova segundo fêmeas que ovipuseram / geração estudada.

Nº de ovos por desova	Fêmeas que ovipuseram					
	1ª geração		2ª geração		3ª geração	
	nº	%	nº	%	nº	%
1 – 5	22	17,6	1	6,7	-	-
6 – 10	13	10,4	2	13,3	3	30,0
11 – 15	17	13,6	5	33,3	1	10,0
16 – 20	30	24,0	3	20,0	2	20,0
21 – 25	12	9,6	1	6,7	3	30,0
26 – 30	22	17,6	-	-	-	-
31 – 35	3	2,4	-	-	1	10,0
36 – 40	3	2,4	1	6,7	-	-
41 – 45	2	1,6	2	13,3	-	-
46 – 50	1	0,8	-	-	-	-
Total de fêmeas	125	100,0	15	100,0	10	100,0
Nº médio ovos/fêmeas	17,5		19,2		17,1	

Na Tabela 12, para as 03 gerações estudadas, observamos que os tempos médios para eclosões dos ovos, duração da fase larval, duração da fase pupal foram de 8,6 dias, 24,3 dias e 7,6 dias, respectivamente, demonstrando que o ciclo de desenvolvimento de *L. intermedia* do Vale do Ribeira ocorreu em tempo médio (39,6 dias) semelhante a outras espécies de flebotomíneos colonizadas.

Tabela 12. Resultado da criação de *Lutzomyia intermedia* em laboratório. Duração máxima, mínima e média (em dias) das diversas fases do ciclo evolutivo.

Fases do	Gerações			Nas 03
ciclo evolutivo	1ª	2ª	3ª	gerações
Desenvolvimento				
embrionário (ovos)				
Máxima	13	9	13	13
Mínima	5	6	6	5
Média	9	8	9	8,6
Duração da fase larval				
Máxima	28	27	29	29
Mínima	17	15	13	13
Média	23	25	25	24,3
Duração da fase pupal				
Máxima	10	10	9	10
Mínima	6	7	7	6
Média	7	8	8	7,6
Duração do ciclo completo				
Máxima	48	49	42	49
Mínima	31	34	40	31
Média	41	43	35	39,6

4.6. Distribuição percentual da mortalidade de adultos e formas imaturas durante o processo de colonização de *Lutzomyia intermedia* segundo alguns fatores.

Na Figura 9, para a primeira geração estudada, são demonstrados os percentuais de perdas de formas imaturas nas diversas fases de criação, nas quais os maiores percentuais corresponderam a ovos que não eclodiram (41,6%) e fêmeas que morreram na oviposição (35,3%) e, o menor, ao desenvolvimento pupal com 7,6%.

Figura 9. Resultado da criação de *Lutzomyia intermedia* em laboratório. Primeira geração: percentual de mortalidade dos elementos nas diversas fases do ciclo evolutivo.

Fatores :

- 1 – Fêmeas silvestres que se recusaram a alimentar em hamster
- 2 – Fêmeas silvestres ingurgitadas em hamsters : morreram sem ovipor
- 3 – Fêmeas silvestres ingurgitadas em hamsters : morreram na oviposição
- 4 – ovos que não eclodiram
- 5 – Larvas de 1º estágio
- 6 – Larvas de 2º, 3º e 4º estádios
- 7 - Pupas

5 - DISCUSSÃO

5.1 - AVALIAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS DE TRANSMISSÃO POR *Lutzomyia intermedia*, s. lat.

Em epidemiologia, a denominação “ vetor biológico “ é dada ao hospedeiro invertebrado, no qual um parasito desenvolve parte de seu ciclo evolutivo, possibilitando-lhe o acesso ao novo hospedeiro. Caracteriza-se pelo caráter de obrigatoriedade para a sobrevivência ou aumento da densidade populacional do parasito (Forattini, 1992). No entanto, a diversidade de fatores que influenciam as suas descobertas, têm conduzido o estudo à situações complexas. Por este motivo, a sistemática para discussão de nossos resultados será baseado em tópicos individuais.

Os novos aspectos epidemiológicos da LTA no Estado de São Paulo demonstram uma ampla distribuição espacial dos casos humanos notificados, sem uma relação clara com o ambiente florestal. Esta suposta mudança no perfil de transmissão da doença reflete condições de sobrevivência do agente parasitário em nível domiciliar. Coincidentemente, *L. intermedia* tem se mostrado a espécie mais apta nesse ambiente, motivo pelo qual precisamos conhecer seu nível de relacionamento com a *Leishmania*.

Sob o ponto de vista antrópico, a condição vetorial de uma determinada espécie de inseto pode também ser avaliada mediante o encontro de seus exemplares portando infecções naturais pelos agentes parasitários (Forattini, 1992). Em decorrência, pensamos também estar avaliando a competência natural de *L. intermedia* não obstante as 5.291 fêmeas dissecada serem negativas para *Leishmania* (Tabela 2).

Espécies como *L. fischeri* e *L. migonei*, com pouco sucesso diante das alterações antrópicas, também foram negativas para aquele agente. *L. ayrozai* com 1,1% dos exemplares dissecados, capturados em peridomicílio das habitações, próximas a mata secundária, teve amostra reduzida no ambiente alterado (Tabela 2). Daí, não ter sido possível a confirmação desta competência, não apenas para *L. intermedia*, mas também para todas as fêmeas capturadas neste estudo.

Em diversas espécies de flebotomíneos já foram detectadas formas flageladas, nas regiões Sul e Sudeste do país. Assim, em *L. migonei*, *L. pessoai* e *L. whitmani* foram encontradas promastigotas sem entretanto, nenhuma caracterização biológica ou bioquímica das estirpes envolvidas embora, normalmente, fossem referidas como *Leishmania braziliensis* (Pessôa & Pestana, 1940; Pessôa & Coutinho, 1940, 1941) .

Para *L. intermedia*, o primeiro encontro de sua infecção natural foi assinalado por Aragão em 1922, quando estudava um foco de LTA no município do Rio de Janeiro. Posteriormente, Forattini & Santos (1952), em área endêmica no norte do Estado do Paraná, encontraram 01 exemplar naturalmente infectado e, em 1972, Forattini e colaboradores assinalaram a presença de promastigotas em 01 exemplar no município de Luiz Antônio-SP (Forattini *et al.*, 1972b).

Encontro mais recente foi assinalado por Rangel *et al.* (1984) quando detectaram 01 exemplar infectado no município do Rio de Janeiro-RJ. O parasito encontrado foi sugerido pertencer ao complexo *braziliensis* por, além de ocorrer em boa quantidade tanto na válvula esofagiana quanto no intestino médio, colonizava o intestino posterior de *L. intermedia*, o que é característico da seção peripilária a qual pertence a *Leishmania (V.) braziliensis*. Esse material inoculado em hamster

produziu lesão compatível com essa leishmania, observando-se a presença de amastigotas com morfologia típica.

Posteriormente, Casanova *et al.* (1995) detectaram 04 exemplares albergando formas flageladas, no Vale do Rio Mogi Guaçu -SP. Entretanto, à semelhança de outras infecções naturais assinaladas, não houve caracterização taxonômica, sendo o parasito referido genericamente como ***Leishmania braziliensis***.

Conforme podemos avaliar pela literatura disponível quanto aos índices de infectividade natural, sumarizados em Williams & Coelho (1978) estes, em sua maioria, apresentaram-se em baixos percentuais. Assim, variações de 0,1% para ***L. cruciata*** até 15,4% para ***L. trapidoi*** já foram verificados. Com relação à espécie ***L. intermedia***, os índices são igualmente baixos, apresentando-se como 0,63% (1/160) em Forattini *et al* (1972b); 0,19% (1/527) em Rangel *et al.* (1984) e 0,22% (4/1819) em Casanova *et al.* (1995).

Para os flebotomíneos do Vale do Ribeira, ao longo de muitos anos, apesar de terem sido dissecados milhares de exemplares fêmeas pertencentes a diferentes espécies, em nenhum deles foram detectadas formas flageladas nos tratos digestivos. Não obstante isto, tais estudos parecem confirmar uma taxa muito baixa de infecção natural em flebotomíneos locais, a despeito do registro por vezes de surtos da doença.

A negatividade, naqueles exemplares dissecados, além de ser compatível com os índices de infectividade verificados na literatura para outras espécies em diferentes áreas geográficas, reflete ainda a complexidade do ciclo de transmissão de ***Leishmania*** em ambientes antrópicos, em especial da espécie ***braziliensis***, apesar de sua ampla distribuição nas Américas.

No âmbito das leishmanioses, ainda que flebotomíneos tenham sido encontrados naturalmente infectados, a interpretação desse tipo de encontro é difícil, uma vez que a presença de formas flageladas no trato digestivo de uma fêmea silvestre não significa, necessariamente, que essas formas pertençam ao gênero ***Leishmania***, e mesmo sendo verdadeiro, essas fêmeas podem não ter condições para transmiti-los à população humana sob diferentes condições naturais (Grimaldi *et al.*, 1989).

Assim, organismos da família Trypanosomatidae de mamíferos não humanos, de répteis e de anfíbios podem ser encontrados no sistema digestivo de flebotomíneos. Além disso, ainda que promastigotas isoladas desses insetos correspondam taxonomicamente à amastigotas do homem na mesma área geográfica, podem não representar especificidade ***Leishmania*** / flebotomíneo. Em decorrência, embora capazes de desenvolverem durante o estágio inicial da digestão sanguínea, possivelmente serão eliminadas quando essa digestão for completada (Killick-Kendrick & Ward, 1981).

As infecções naturais dos flebotomíneos e dos animais portadores da parasitose são reconhecidas, normalmente, mediante isolamento do agente parasitário em cultivos “in vivo” ou “in vitro”. Entretanto, esses cultivos nem sempre revelam-se bem sucedidos, mesmo quando conhecidas estirpes de ***Leishmania***, originárias de flebótomos ou mamíferos, são inoculadas em hamsters e meios de culturas compatíveis (Killick-Kendrick & Ward, 1981; Young & Lawyer, 1987). Um outro problema diz respeito à necessidade da tipagem das espécies infectantes, parâmetros bioquímicos e imunológicos necessários para a caracterização e classificação de estirpes de ***Leishmania*** (Machado & Milder, 1986).

No Estado de São Paulo, diversos trabalhos desenvolvidos com o objetivo de detectar hospedeiros reservatórios de ***Leishmania***, relataram o encontro desses parasitas, tanto em animais silvestres como domésticos. Nesses animais, ***Leishmania braziliensis***, *s. lat.* (Forattini, 1960a; Forattini *et al.*, 1972a, 1973; Yoshida *et al.*, 1990) e ***Leishmania (L.) forattinii*** (Yoshida *et al.*, 1993) foram as espécies identificadas mediante principalmente critérios epidemiológicos e biológicos e, mais raramente, por critérios bioquímicos e imunológicos.

Para a população humana, até o momento, ***Leishmania braziliensis*** parece ser a espécie responsável pela maioria dos casos autóctones de LTA verificados nesse Estado (Tolezano *et al.*, 1988, 1991, 1991a; Yoshida *et al.*, 1990; Stolf *et al.*, 1993; Giorgio *et al.*, 1996).

No Vale do Ribeira, a presença de ***Leishmania*** em animais silvestres, domésticos e na população humana também tem sido relatada a partir de trabalhos voltados aos aspectos epidemiológicos da LTA na região.

Para os primeiros casos autóctones de LTA, a espécie do agente parasitário foi considerada como pertencente ao complexo ***braziliensis*** mediante, principalmente, análise de aspectos clínicos da parasitose, conforme observamos nos trabalhos de Bastos (1978) e Rocha e Silva *et al.* (1980). Posteriormente, Tolezano *et al.* (1980) ao isolarem uma estirpe de caso humano, observaram seu lento crescimento em meio de cultura e o não desenvolvimento de lesões nos animais inoculados. Sugeriram então, ser o agente integrante do complexo ***braziliensis***.

Em um trabalho mais abrangente para identificação de espécies de ***Leishmania*** que circulavam na região, Machado & Milder (1986) isolaram estirpes de 04 casos humanos. Mediante utilização de critérios biológicos as estirpes foram

incluídas no complexo ***braziliensis*** e, mediante análise bioquímica e imunológica, foram indicadas como subespecíficas de ***Leishmania (V.) braziliensis***.

Com relação aos animais domésticos, Machado & Milder (1986) também isolaram uma estirpe de ***Leishmania*** de um cão doente sendo o agente parasitário classificado como ***Leishmania (V.) braziliensis*** mediante critérios biológicos, bioquímicos e imunológicos. Posteriormente, Gomes *et al.* (1990) identificaram 02 cães leishmanióticos mediante biopsia de lesão e identificação parasitológica direta do parasito.

Para os animais silvestres, Tolezano *et al.* (1988a) isolaram por hemocultura uma estirpe de ***Leishmania*** do roedor ***Akodon sp.***, sendo caracterizada como pertencente ao grupo ***mexicana*** mediante critérios biológicos e bioquímicos, sendo essa mesma estirpe reclassificada como ***Leishmania (L.) amazonensis*** (Tolezano, 1994). Posteriormente, Gomes *et al.* (1989a) monitorando a transmissão da LTA, mediante exposição de hamsters sentinelas, detectaram um único animal (n=13) com pequena lesão na pata dianteira, 05 meses após o experimento. Essa estirpe MMES/BR/82/HM1B, foi identificada com anticorpo monoclonal subespécie-específico como pertencente à ***Leishmania braziliensis***.

Conforme podemos avaliar, pelos dados revisados da literatura, que apesar da descoberta da LTA no Estado de São Paulo datar de início do século, pouca informação está registrada sobre as diferentes estirpes e espécies de ***Leishmania*** que circulam entre a população humana, animais domésticos e silvestres. Em decorrência, o papel representado pelos animais silvestres e domésticos nesse processo de dispersão suscita ainda de estudos complementares.

Segundo Gomes & Neves (1998), a proximidade de focos selváticos remanescentes com áreas povoadas, parece formar elos permanentes para

emigração e circulação de ***Leishmania***, além dos limites dos focos naturais . Isto significa admitir a possibilidade de existirem ciclos secundários de ***Leishmania***, não se sabendo ainda, a maneira pela qual eles se processam, onde, quando e sob qual taxa irão se manifestar. Assim, permanece obscura a forma pela qual ***Leishmania braziliensis*** se dispersa para área extraflorestal, haja vista o caráter esporádico do encontro de animais silvestres, domésticos e de flebotomíneos com infecções naturais (Gomes *et al.*, 1990).

Segundo Rangel *et al.* (1993), embora não exista consenso sobre a principal característica para definir a condição vetorial de uma dada espécie de flebotomíneo, a presença de promastigotas no trato digestivo de uma fêmea tampouco constitui característica definitiva para considerar a espécie como vetora de leishmaniose.

De qualquer modo, entretanto, o isolamento de ***Leishmania*** em flebotomíneos antropofílicos, não somente fornece uma forte evidência de sua condição vetorial como também serve de alicerce para estimar o risco de infecção em determinado tempo e área geográfica (Young & Lawyer, 1987). Além disso, o local de desenvolvimento no trato digestivo do inseto silvestre (Figura 10) e a intensidade da infecção podem indicar tanto o subgênero de ***Leishmania*** como também a habilidade do inseto para suportar o desenvolvimento do parasito e, possivelmente, transmiti-lo via picada (Killick -Kendrick, 1990) .

No Vale do Ribeira, mediante nichos criados em ambientes pós-devastação, facilitou-se o aparecimento de condições ecológicas favoráveis à expansão de uma espécie de flebotomíneo. Este favorecimento parece ter recaído, principalmente, sobre a espécie ***L. intermedia*** tornando-a fator indispensável à

Figura 10

Espermateca de *Lu. intermedia*, s.lat.

do Vale do Ribeira

Promastigotas no estômago e piloro

de *Lu. intermedia*

circulação de ***Leishmania*** em ambiente domiciliar. De forma coincidente, aí registrou-se maior número de casos humanos, sejam esporádicos ou em microsurtos.

Paralelamente às infecções naturais, a capacidade vetorial mereceria estar sendo avaliada num contexto epidemiológico que contribua à elucidação do papel de ***L. intermedia*** na transmissão da LTA. Neste particular, sabe-se que a antropofilia dos flebotomíneos neotropicais é bastante eclética, podendo sugar numerosos animais de sangue quente, inclusive o homem. Assim, a necessidade de alimento sanguíneo pode determinar a condição desses insetos de tornarem-se portadores de ***Leishmania*** ao exercerem a hematofagia em animais silvestres considerados como reservatórios e, possivelmente, em alguns animais domésticos contaminados pelo agente (Chaniotis, 1975; Endris *et al.*, 1984; Falqueto, 1995).

Uma vez que a transmissão de ***Leishmania*** para o homem ocorre, normalmente, durante o repasto sanguíneo ou na sua tentativa, o grau de antropofilia dos insetos é um dos fatores críticos em determinar a frequência dos contatos flebotomíneo/homem e, em decorrência, o maior ou menor número de casos humanos da parasitose.

Como exemplo, em Belize e no México, ***Leishmania (L.) mexicana*** é mantida na natureza por roedores dos gêneros ***Ototylomys*** e ***Heteromys***. Entretanto, o inseto transmissor ***L. olmeca olmeca***, é considerado como uma espécie que apresenta baixo grau de antropofilia. Assim, a “úlceras dos chicleros” seria uma doença rara não fosse a necessidade dos trabalhadores permanecerem longo tempo na floresta para a coleta do látex, em contato prolongado com esses insetos (Lainson & Shaw, 1978).

Na Amazônia, roedores dos gêneros *Proechimys* e *Oryzomys* constituem os principais reservatórios de *Leishmania (L.) amazonensis*. Embora *L. flaviscutellata* seja considerado um bom transmissor do parasito para esses animais, o mesmo não se pode falar em relação ao homem pois tem mostrado pouca atratividade para ele. Como resultado, a incidência desse parasito chega a 20,0% entre roedores silváticos, mas com poucos casos humanos identificados (Lainson & Shaw, 1978).

Ainda na Amazônia, os casos humanos de LTA determinados por *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (V.) naiffi* são raros pois os flebotomíneos transmissores dificilmente praticam antropofilia: *L. ubiquitalis* e *L. ayrozai* / *L. squamiventris* / *L. paraensis*, respectivamente (Lainson *et al.*, 1994).

No Estado do Espírito Santo, o estudo sobre a especificidade alimentar dos flebotomíneos no ambiente silvestre, utilizou-se o roedor *Proechimys iheringi* e o homem como iscas atrativas. Dos flebotomíneos atraídos pelo roedor, 98,1% foram da espécie *L. gasparviannai*. Uma vez que essa espécie só foi capturada sobre o roedor, seu papel vetorial seria restrito à transmissão enzoótica do parasito e, não habitualmente, à população humana (Falqueto *et al.*, 1985).

Para a espécie *L. intermedia*, a antropofilia é uma das evidências epidemiológicas que tem sido acumuladas no sentido de estabelecer a capacidade vetorial para *Leishmania braziliensis*, desde que Aragão (1922) relatou seu envolvimento em foco de LTA no Rio de Janeiro. Assim, em diversos trabalhos realizados com intuito de caracterizar espécies antropofílicas de flebotomíneos mediante isca humana, *L. intermedia* foi frequentemente capturado em domicílios, peridomicílios e, mais raramente, dentro de matas, em diferentes regiões neotropicais (Rangel *et al.*, 1986, 1998; Hashiguchi *et al.*, 1992; Aguiar *et al.*, 1993;

Salomon *et al.*, 1995). O caráter endófilo de sua atividade no Vale do Ribeira representa indicação de influência na transmissão da LTA para o homem (Gomes *et al.*, 1986).

Em estudo desenvolvido em Mesquita (RJ) , Rangel *et al.* (1990) evidenciaram a antropofilia de *L. intermedia* ao verificarem que dentre 4.685 exemplares fêmeas capturados, 95% pertenciam a essa espécie. Destes, 1.128 exemplares foram capturados no exercício da hematofagia em humanos. Igualmente, 1.825 fêmeas foram capturadas em equinos, 274 em cães e 502 em frangos.

A antropofilia de *L. intermedia* também ficou evidenciada quando Falqueto (1995), com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia da LTA, realizou estudo mais abrangente envolvendo preferência alimentar de flebotomíneos em relação ao homem, cão e 23 espécies de animais silvestres em dois municípios do Estado do Espírito Santo.

Os resultados desses estudos demonstraram que de 41.010 exemplares capturados, 10.335 corresponderam à fêmeas coletadas com isca humana. Destas, 4.727 (46%) foram de *L. intermedia*; 2.278 (22%) de *L. fischeri*; 1.776 (17%) de *L. whitmani* e, 1.271 (12%) de *L. migonei*. Estas mesmas espécies antropofílicas foram atraídas intensamente pelo cão, conforme demonstrado pelos percentuais obtidos dentro de 20.288 exemplares (machos e fêmeas) capturados enquanto os animais silvestres atraíram em pequenas proporções *L. fischeri*, *L. whitmani* e *L. migonei* em um total de 10.179 exemplares (machos e fêmeas). Assim, ficou sugerido o padrão de transmissão domiciliar tendo como fonte de infecção o cão e talvez o homem.

Na região do Vale do Ribeira, o caráter antropofílico da espécie *L. intermedia* foi ressaltado por Forattini *et al.* (1976) e Rocha e Silva *et al.* (1980) decorrente de observações quanto aos seus hábitos domiciliares onde, provavelmente, buscariam abrigo e realizariam a hematofagia. Posteriormente, a antropofilia dessa espécie foi pesquisada mediante utilização de iscas humanas em dois trabalhos relacionados .

Gomes *et al.*, (1983) ao realizarem observações sobre o ritmo diário da atividade de *L. intermedia* em ambiente florestal residual, obtiveram 886 exemplares fêmeas. Os autores ressaltaram não só os hábitos noturnos dessa espécie, ou seja, pico elevado entre 22 horas e 01 hora, como também o seu elevado hábito antropofílico, o que teria influenciado decisivamente em sua frequência à fonte sangüínea humana.

Gomes & Galati (1989) em estudo para determinar a composição da fauna antropofílica no município de Cananéia (SP) obtiveram 24 exemplares (63%) de *L. intermedia* dentre 38 capturados, em ambiente peridomiciliar .

Considerando o grande número de animais silvestres (Forattini, 1960a; Gomes *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993), domésticos (Forattini, 1953; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 1990) e seres humanos (Forattini & Oliveira, 1957; Machado & Milder, 1986; Gomes *et al.*, 1992) nos quais, foram detectadas lesões leishmanióticas e/ou *Leishmania*, pode-se admitir que muitos desses casos poderiam ter surgido quando essas fontes serviram para o repasto sangüíneo de *L. intermedia* infectados.

A ausência de *Leishmania* durante o estudo, portanto poderá estar refletindo uma situação transitória do agente em ambiente domiciliar. Aliás, esta suspeita já foi levantada por Gomes (1992), como fator que pareceria estar

influenciando infecções humanas em baixo nível e o caráter focal, com cerca de 40% de casos ocorrendo em um único indivíduo da família.

A concomitância da distribuição espacial entre leishmaniose e flebotomíneos é outro fator epidemiológico que merece ser focado na análise em curso.

No Vale do Ribeira, a ocorrência de LTA está associada a ambiente pós devastado com presença de mata remanescente ou residual e ao aparecimento do fenômeno da domiciliação de vetores, resultando em casos humanos esporádicos ou microsurtos que se caracterizam como de ocorrência cíclica (Gomes, 1992).

A devastação do ambiente natural no início do século, embora decisiva na alteração da composição faunística dos flebotomíneos, parece ter favorecido a espécie ***L. intermedia***, uma vez que, no modelo epidemiológico emergido passou a ocupar posição de dominância praticamente absoluta, ao contrário do que ocorreu com as espécies silvestres que se tornaram pouco frequentes ou mesmo desapareceram (Tolezano *et al.*, 1980).

Estudos sobre a epidemiologia das demais espécies antropofílicas encontradas no Estado de São Paulo demonstraram que, ***L. whitmani*** tem papel vetorial apenas em ambiente extradomiciliar em regiões com relevos de até 600 metros de altitude e tem desaparecido de ambientes que sofreram considerável ação antrópica. Por conta disto, esta espécie passou a ser de importância secundária pois seu contato com o homem depende de sua invasão nos resíduos de florestas remanescentes. ***Lutzomyia pessoai*** compartilha a mesma situação de ***L. whitmani***, porém distribui-se somente na região nordeste para sudeste. ***Lutzomyia fischeri*** é amplamente distribuído em ambientes de mata e margem de mata e,

embora freqüente nos ambientes domiciliares, sua pouca densidade nas capturas não evidencia importância epidemiológica nesses locais (Gomes *et al.*, 1995 ; Gomes & Neves, 1997)

Subseqüentemente, contribuiu a apreciável valência ecológica de *L. intermedia* a qual é dotada de comportamento eurítopo (Gomes *et al.*, 1980). Além disso, seu acentuado grau adaptativo a ecótopos artificiais fizeram com que lhe fosse atribuída a capacidade de atravessar barreiras em ambiente aberto com conseqüente estabelecimento de criadouros extra-florestais (Gomes & Galati , 1987; Taniguchi *et al.*, 1991) .

Ainda no ambiente antrópico dessa região, diversos estudos eco-epidemiológicos demonstraram a adaptação de *L. intermedia* às margens de matas e capoeiras (Gomes & Galati, 1987) com presença constante e expressiva em domicílios e peridomicílios (Forattini *et al.*, 1976; Bastos, 1978; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1986, 1990; Gomes & Galati, 1989) bem como em abrigos de animais domésticos (Gomes *et al.*, 1980).

Com a utilização de dados secundários gerados pelo sistema oficial de saúde do Estado de São Paulo, Domingos (1997) resumizou a distribuição das espécies de flebotomíneos nos municípios do Vale do Ribeira no período de 1985 a 1996.

Nas 693 pesquisas entomológicas realizadas mediante armadilha CDC, Shannon e lençol / parede, foram capturados 4.773 exemplares de flebotomíneos pertencentes a 07 espécies: *Lutzomyia intermedia*, *L. migonei*, *L. fischeri*, *L. ayrozai*, *L. firmatoi*, *L. pascalei* e *L. pestanai*. Destas, *L. intermedia* foi a espécie dominante com cerca de 99% do total dos exemplares capturados.

Com relação aos locais de capturas, nos peridomicílios foram obtidos 3. 727 exemplares (3. 690 *L. intermedia*, 14 *L. migonei*, 18 *L. fischeri*, 03 *L. ayrozai* , 01 *L. pascalei* e 01 *L. pestanai*) com predominância de fêmeas Neste ambiente, todos os municípios apresentaram pesquisas positivas para *L. intermedia* com percentuais bastante variáveis. Assim, nos municípios de Iguape, Cananéia e Miracatu foram obtidos os menores percentuais enquanto que Barra do Turvo e Registro destacaram-se como os de maiores .Contrariamente, no intradomicílio foram obtidos 1. 046 exemplares (1.033 *L. intermedia*, 11 *L. migonei*, 02 *Lu. firmatoi*) também com predominância de exemplares fêmeas. *Lutzomyia intermedia* compareceu a esse ambiente em todos os meses do ano na quase totalidade das capturas. Nos municípios de Cananéia e Iguape, sua presença foi muito reduzida e esporádica, o que coincide com a menor incidência de LTA entre os municípios.

Segundo Domingos (1997), foi constatada na região do Vale do Ribeira a ampla distribuição de *L. intermedia* em ambiente domiciliar de localidades com transmissão de LTA. Verificou-se também a dominância desse díptero, em relação às outras espécies de flebotomíneos e, considerando o seu comportamento endofílico e o uso do domicílio como abrigo, ratificou-se a hipótese de diversos estudos que suspeitavam ser o principal vetor de LTA e que a transmissão ocorreu nesse ambiente.

A espécie *L. migonei* tem ampla distribuição no Estado, a despeito da existência ou não de floresta primitiva, estando limitado a uma altitude de até 750 metros acima do nível do mar. Nesta altitude, ocorre a maioria dos casos humanos de LTA sendo que, *L. migonei* compartilha com *L. intermedia* a mesma distribuição geográfica. Entretanto, a densidade, sinantropia, antropofilia e o alto grau de

endofilia dessa última espécie, a coloca como aquela que mais comumente se sobrepõe às áreas de ocorrência da doença (Gomes *et al.*, 1995; Gomes & Neves, 1997).

Os 914 casos de LTA verificados no período de 1981 a 1995 (CVE / SUCEM, 1995) ocorreram de forma intermitente e dispersa entre as localidades municipais e, distribuíram-se em sua maioria, em áreas rurais e, em menor escala, em ambiente periurbano. Na população humana, ambos os sexos foram atingidos, com registro de casos em todas as faixas etárias e nos mais diferentes setores ocupacionais. Pesquisa de vetores nessas áreas foram feitas, revelando presença constante de *L. intermedia*.

Verificamos assim, que a análise desses determinantes epidemiológicos sugeriu, desde os primeiros casos assinalados, que a transmissão da parasitose ocorre principalmente, em ambiente peridomiciliar e domiciliar (Forattini & Oliveira, 1957; Rocha e Silva *et al.*, 1980; Tolezano *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1992; Domingos ,1997). Corroborando com isto, as observações de que *L. intermedia* compareceu em todas as nossas capturas positivas com percentual de até 95% dentre as espécies capturadas.

5.2 - AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS COM *Lutzomyia intermedia*, s. lat. DO VALE DO RIBEIRA.

Uma vez que não foi possível a confirmação da competência natural de *L. intermedia*, nos propusemos a avaliar a capacidade dessa espécie de flebotomíneo de se infectar com diferentes estirpes de *Leishmania* (V). *braziliensis*, propiciar sua multiplicação e/ou desenvolvimento e, subsequente, transmiti-las a outro hospedeiro, mediante caráter experimental.

A literatura existente sobre a suscetibilidade de flebótomos frente a diferentes espécies de *Leishmania*, tanto no Velho como no Novo Mundo, é bastante ampla. Em decorrência, os percentuais de exemplares albergando formas flageladas verificados em diversos trabalhos experimentais não são uniformes, conforme podemos observar pelas descrições de Hertig & McConnell (1963) e Lainson *et al.* (1979).

Hertig & McConnell (1963) verificando a suscetibilidade de *Lutzomyia* neotropicais frente a estirpes panamenhas de *L. braziliensis*, s.lat. encontraram índice de positividade de 82% (73 exemplares infectados / 89 dissecados) para *L. sanguinaria*; 77% (55/71) para *L. gomezi*; 95% (19/20) para *L. panamensis*; 89% (8/9) e 57% (4/7) para *L. ylephiletor*. Esses índices foram obtidos a partir de insetos colonizados com 01 a 07 dias de emergência, e dissecados após 02 a 16 dias do ingurgitamento.

Lainson *et al.* (1979) estudando o desenvolvimento de três estirpes *Leishmania peruviana* em exemplares colonizados de *L. longipalpis* encontraram índices de positividade de 58,8% (50 exemplares infectados/85 dissecados), 64,5% (20/31) e 53,1% (17/32) para os experimentos realizados em temperatura média de

25°C e umidade relativa de 90%. Esses insetos tinham entre 04 e 08 dias de emergência, sendo dissecados após 04 a 08 dias do ingurgitamento.

O fatores que influenciam a maior ou menor suscetibilidade dos flebotomíneos frente a ***Leishmania*** não são totalmente conhecidos. Entretanto, o tipo de fonte alimentar sanguínea e a especificidade flebotomíneo/***Leishmania*** na natureza parecem estar entre aqueles de maior relevância.

Os primeiros experimentos de suscetibilidade voltados à espécie ***L. intermedia*** foram realizados por Chagas (1940) quando colocou exemplares silvestres e colonizados para ingurgitarem em dois cães leishmanióticos por ***Leishmania chagasi***. Dos 146 exemplares dissecados que se ingurgitaram em um cão experimentalmente infectado, não foi encontrado nenhum exemplar com formas promastigotas e, de 43 exemplares que se ingurgitaram em cão naturalmente infectado, 12 (28%) fêmeas foram detectadas com formas flageladas.

Coelho *et al.* (1967) realizaram estudos sobre a suscetibilidade de flebótomos silvestres, capturados em Nova Lima e Belo Horizonte -MG, frente a um isolado originário de caso clínico compatível com leishmaniose cutâneo-mucosa do Estado do Ceará e outro compatível com leishmaniose nodular difusa do Estado da Bahia. Dos 23 exemplares de ***L. intermedia*** que ingurgitaram em lesão de hamster experimentalmente infectados com estirpe da Bahia, verificou-se que todos eles se infectaram .

No experimento de Chagas (1940), para as 12 fêmeas infectadas, o autor relata apenas que em 02 fêmeas foram detectadas promastigotas após 03 dias do ingurgitamento e, em 01 fêmea, após 06 dias. Em Coelho *et al.* (1967) , os 23 exemplares foram dissecados após 02 a 03 dias do ingurgitamento. Em ambos

os casos, entretanto, não houve referência quanto a possível existência de formas evolutivas no piloro e íleo.

Rangel *et al.* (1992) estudando o desenvolvimento de duas estirpes de ***Leishmania braziliensis***, isoladas no Rio de Janeiro (BR), em ***L. intermedia***, verificaram índice máximo de positividade de 58%, correspondendo ao quarto dia após o ingurgitamento sendo esses insetos dissecados entre 12 horas e 10 dias. A infecção foi considerada estabelecida uma vez que, entre o quinto e o décimo dia, após digestão sanguínea, observaram-se a formação de diversos aglomerados de promastigotas no intestino posterior, além de intensa infecção ao nível da válvula cardíaca.

Rangel *et al.* (1993) em novo estudo de desenvolvimento de espécies de ***Leishmania*** isoladas na Colômbia, em exemplares colonizados de ***Lu. intermedia***, verificaram índices de positividade de 36% (62 exemplares infectados/172 dissecados); 65, % (172 / 264) e de 25,% (46 / 181) com ***Leishmania braziliensis***, ***L. guyanensis*** e ***L. panamensis***, respectivamente.

No nosso trabalho, os testes de suscetibilidade foram realizados com exemplares de ***L. intermedia*** silvestres e colonizados. Estes testes tinham o intuito de determinar o número de fêmeas silvestres com idade cronológica indeterminada e de fêmeas colonizadas com idade cronológica conhecida que se infectavam em hamsters experimentalmente infectados com duas estirpes de ***Leishmania (V.) braziliensis***.

Conforme podemos observar nas Tabelas 4 e 5, os índices médios de suscetibilidade como 74% (exemplares silvestres) e 70% (exemplares colonizados) são mais elevados que o de 28% (12 infectados / 43 dissecados) verificados por Chagas (1940) para a associação ***Leishmania chagasi* / *L. intermedia*** e ao de

58% obtido por Rangel *et al.* (1992) com a associação ***Leishmania braziliensis*** / ***L. intermedia*** e, àqueles como 36%; 65% e 25% frente às estirpes colonizadas de ***Leishmania braziliensis***, ***Leishmania guyanensis*** e ***Leishmania panamensis*** segundo Rangel *et al.* (1993) utilizando-se de mesma espécie de ***Lutzomyia***. Com relação aos experimentos realizados por Chagas (1940), deve ser ressaltado que tratava-se de associação considerada não natural.

Os nossos índices, entretanto, foram menores que os 100% de suscetibilidade verificado por Coelho *et al.* (1967) com relação a exemplares silvestres de ***L. intermedia*** (23 infectados / 23 dissecados) frente a uma amostra de ***Leishmania*** isolada de um caso clínico compatível com leishmaniose nodular difusa.

Dentre 400 exemplares (silvestres e colonizados) colocados para realizarem o repasto sangüíneo, 70 exemplares (17,5%) não ingurgitaram, possivelmente, devido a fatores a serem discutidos no item 5.4. de “mortalidade de elementos na colonização”. Dos 330 exemplares (166 silvestres / 164 colonizados) que se ingurgitaram, 92 exemplares (43 silvestres / 49 colonizados), embora ingurgitados, não se infectaram.

Conforme os resultados dos trabalhos referentes à fonte alimentar sangüínea, o número de flebotomíneos ingurgitados que não se infectam mediante utilização de animais experimentalmente infectados ou de alimentadores artificiais, é bastante variável. Em decorrência, a causa principal da negatividade naqueles trabalhos e em relação aos nossos 92 exemplares ingurgitados não infectados é, até o presente momento, de difícil explicação. Entretanto, algumas possibilidades podem ser aventadas.

Os hamsters disponíveis para o repasto sangüíneo eram acondicionados tentando expor somente as patas traseiras ulceradas. Apesar de estarem contidos, após o efeito do anestésico se tornavam irrequietos, movimentando bastante essas patas, possibilitando que muitos insetos não ingurgitassem ou o fizessem fora das áreas ulceradas. Este tipo de ocorrência também foi descrita por Vexenat *et al.* (1986) quando um lote de insetos não se infectou por ingurgitarem fora da área ulcerada de cão leishmaniótico.

Nos hamsters, a inoculação de parasitas do complexo **mexicana**, leva ao desenvolvimento rápido e progressivo de uma lesão nodular, tipo histiocitoma com grande riqueza de parasitos. Com relação às do complexo **braziliensis**, apresentam uma evolução lenta, bem menos exuberante e, relativamente menor número de parasitas. Killick-Kendrick *et al* (1977a), ao verificarem que muitas fêmeas ingurgitadas em lesão de hamster por **Leishmania braziliensis** não se infectavam, consideraram a possibilidade da não ingestão de amastigotas quando em pequeno número nessas lesões.

A idade da infecção nos animais infectados seria outro fator que influenciaria o subsequente desenvolvimento do parasita nos flebotomíneos. Silva *et al.* (1990) observaram na associação hamsters/**Leishmania guyanensis** que lesões com até 06 semanas de evolução, fêmeas de **L. longipalpis** não se infectaram, só o fazendo a nível de 100%, quando as lesões estavam com mais de 14 semanas de evolução. Lainson *et al.* (1990) não encontraram nenhum exemplar de **Leishmania longipalpis** infectado quando ingurgitado sobre raposa / **Leishmania chagasi** com 08 semanas de infecção, só vindo a fazê-lo, a nível de 7,4%, após a 15ª semana pós infecção.

Os hamsters que utilizamos para o repasto sanguíneo dos flebótomos estavam inoculados com um mínimo de 06 semanas de antecedência e, muito possivelmente, as lesões encontravam-se maduras com a quantidade de amastigotas suficientemente adequada para serem sugadas e desenvolverem nos insetos, haja vista o número de fêmeas infectadas e não infectadas nos diversos lotes representados nas Figuras 7 e 8.

Segundo Lewis & Ward (1987) a idade cronológica das fêmeas seria outro fator que, possivelmente, influenciaria as suas suscetibilidades frente a diferentes espécies de *Leishmania*. Assim, os percentuais de positividade poderiam ser discrepantes para as fêmeas silvestres com idade diferenciada em relação àquelas colonizadas com idade pré estabelecida. Entretanto, Rojas *et al.* (1995) obtiveram índices de suscetibilidade similares entre populações silvestres (60%) e colonizadas (65%) e, no nosso trabalho, os percentuais médios também foram semelhantes entre exemplares silvestres (74%) e colonizados (70%).

A disponibilidade de alimento açucarado para os flebótomos, tanto em condições experimentais como na natureza, é admitido como fator importante a influenciar o desenvolvimento de *Leishmania* nesses insetos e, sua subsequente transmissão via picada (Young *et al.* 1980; Molyneux *et al.* 1991). Warburg & Schlein (1986) ao testarem os efeitos de dietas artificiais sobre o desenvolvimento de *Leishmania major* em *Phlebotomus papatasi* não encontraram diferença significativa nos índices de infectividade e na localização intestinal desses parasitos, frente a diferentes açúcares analisados. Entretanto, encontraram uma maior percentagem de fêmeas infectadas no grupo alimentado com uma mistura de albumina e sacarose, sugerindo assim, a não existência de um único fator nutricional essencial para o estabelecimento da infecção nos flebotomíneos

Nos nossos experimentos, uma vez que a disponibilidade de solução açucarada a 50% embebida em algodão era uma constante, tornou-se difícil qualificar se esta fonte energética influenciou no estabelecimento das infecções em ***L. intermedia***. Apesar disso, deve ser ressaltado que, embora o aspecto “alimento açucarado” seja considerado essencial no estabelecimento das infecções em flebotomíneos e, influencie sua subsequente transmissão via picada, novos estudos deverão ser avaliados para melhor compreensão de seu mecanismo efector.

Com relação à presença de bactérias no conteúdo intestinal de insetos, Adler & Theodor (1957) consideravam que um intestino de flebotomíneo bacteriologicamente estéril era necessário para o desenvolvimento de ***Leishmania*** e que as bactérias podiam ser ingeridas durante o repasto açucarado ou sangüíneo. Killick-Kendrick (1979) salientou que flebotomíneos alimentados, experimentalmente, sobre passas não esterilizadas apresentavam grande número de bactérias no intestino e alto índice de mortalidade.

Schlein *et al.* (1985) observaram que a contaminação por bactérias no intestino dos flebotomíneos é de ocorrência mais comum naqueles criados em laboratório do que nos capturados no campo. Normalmente, os capturados no campo são capazes de controlar um número limitado de bactérias, pois seu mecanismo de defesa é ineficiente contra infecções maciças. Contaminações no laboratório ocorreriam pelo uso, muitas vezes, de soluções açucaradas velhas apresentando bactérias e fungos. Soluções açucaradas frescas, ainda que não esterilizadas, não causariam intensas contaminações.

No nosso trabalho, as soluções açucaradas, não estéreis, eram renovadas semanalmente, podendo ser considerada como de preparação recente.

Ainda assim, um número expressivo de fêmeas ingurgitadas que não se infectaram, albergavam grande quantidade de bactérias nos seus tubos digestivos . Entretanto, não sendo conclusivo se tais contaminações eram oriundas das soluções açucaradas ou dos hamsters que serviam para o repasto sanguíneo, e se influenciaram a não infectividade das fêmeas.

Os percentuais de positivities de 76,1% e 72,0% para a associação ***L. intermedia*** (silvestre) / ***Leishmania braziliensis*** (M2903) e ***L. intermedia*** (silvestre) / ***Leishmania braziliensis*** (7312), respectivamente, demonstraram espectros similares de suscetibilidade dos exemplares desta espécie de flebotomíneo, capturados no ambiente natural e, em decorrência com idade cronológica diferenciada, frente a duas diferentes estirpes de ***Leishmania braziliensis***. Para os insetos colonizados, os índices de positividade de 67% frente à estirpe M2903 e de 73% frente à estirpe 7312, demonstram da mesma forma essa suscetibilidade mesmo quando os insetos foram oriundos de colonização e com idade cronológica conhecida

A sequência do desenvolvimento e localização de ***Leishmania*** no trato alimentar dos flebótomos ocorrem de forma diferenciada, permitindo-se então que fossem estabelecidos dois subgêneros distintos: ***Leishmania*** e ***Viannia***. Integram o primeiro, parasitos em cujos ciclos de vida desenvolvem-se limitados às porções média e anterior do tubo digestivo do inseto. No segundo, estão incluídos aqueles que apresentam fases de desenvolvimento conectadas às porções posterior (piloro), média e anterior do tubo digestivo do inseto. Esses subgêneros correlacionam-se às seções Suprapilária e Peripilária, respectivamente (Lainson & Shaw , 1987).

A colonização do intestino por ***Leishmania*** complexo ***braziliensis*** antes de sua migração às partes anteriores do insetos, tem sido considerada como

fase importante do ciclo natural desses parasitos (Killick-Kendrick *et al.*, 1977a; Lainson *et al.*, 1977a). Assim, as similares localizações observadas em nossos experimentos após o sétimo dia do ingurgitamento e, a observação de pequenos aglomerados de promastigotas no piloro, vêm realçar o modelo de desenvolvimento “Peripilária” para as estirpes do complexo ***braziliensis*** testadas em relação a ***L. intermedia*** do Vale do Ribeira.

Os estágios evolutivos de ***Leishmania*** obtidos em ***L. intermedia*** do Vale do Ribeira foram similares, em tamanho e morfologia, àqueles descritos na literatura, tanto para as associações naturais (Jaramillo *et al.*, 1994; Rangel *et al.*, 1992) como para aquelas consideradas como não naturais (Lawyer *et al.*, 1987; Walters, 1993).

O aspecto de similaridade já foi observado por Coelho (1964) em relação ao desenvolvimento de mesma espécie de ***Leishmania*** em diferentes espécies de ***Lutzomyia*** consideradas como associações não naturais e, por Walters (1993) em várias associações de flebotomíneo/***Leishmania***. Nesses experimentos os estágios morfológicos obtidos foram, na maioria das vezes, de aspectos similares tanto para as associações naturais como não naturais.

Apesar da relativa facilidade na obtenção de flebotomíneos infectados com promastigotas em suas cárdias e faringes, poucos resultados satisfatórios foram obtidos quanto a transmissão de ***Leishmania*** via picada. Ainda assim, esses resultados contemplaram, principalmente, aquelas do complexo ***mexicana*** (Williams & Coelho, 1978; Killick-Kendrick, 1986).

Para os flebotomíneos, a cada repasto sanguíneo completo corresponderia um lote de ovos maturados e sua total ou parcial oviposição, dentro do fenômeno denominado de concordância gonotrófica.

A oportunidade de um novo repasto sangüíneo dependerá da sobrevivência dos indivíduos femininos após a oviposição. Entretanto, tem-se verificado que um grande percentual de fêmeas, tanto silvestres quanto colonizadas, morre durante e/ou logo após as posturas. Com isso, o número de fêmeas com potencial de realimentação diminui prejudicando a viabilidade dos experimentos via picada (Eldridge *et al.*, 1963; Ward , 1977; Rangel *et al.*, 1985; Ryan *et al.*, 1987).

Um outro fator importante na transmissão de ***Leishmania*** pelos flebotomíneos é representado pelo número de vezes que uma fêmea poderia realizar o repasto sangüíneo (Johnson *et al.*, 1963). Após o primeiro ingurgitamento, utilizando-se de fontes alimentadoras contendo formas evolutivas de ***Leishmania***, um segundo repasto sangüíneo, total ou parcial, sobre animais não infectados, seria necessário para a transferência desses parasitos nos experimentos via picada (Dougherty *et al.*, 1993).

Apesar da suposta necessidade de um segundo repasto sangüíneo para transferir os parasitos, existem relatos de experimentos via picada, que foram bem sucedidos a partir de fêmeas que não alimentaram ou que só o fizeram parcialmente (Strangway-Dixon & Lainson , 1962; Beach *et al.*, 1984; 1985; Ryan *et al.*, 1987a).

Lawer & Young (1987) com o objetivo de verificar a capacidade vetorial de ***L. diabolica*** e ***L. shannoni***, concluíram que a transferência de ***Leishmania*** pode ser realizada sem repleção completa ou apenas parcial pelas fêmeas. A mera inserção da probóscida seria suficiente para o sucesso da transmissão via picada.

A disponibilidade de alimento açucarado na dieta artificial dos flebotomíneos é outro elemento considerado como essencial para a transmissão de

Leishmania via picada, conforme resultados obtidos para a associação **Phlebotomus argentipes / Leishmania donovani** (Smith *et al.*, 1941; Shortt , 1945). Entretanto, a inclusão rotineira de diferentes açúcares ou passas na dieta de insetos colonizados, não necessariamente, resultaram em transferências bem sucedidas, aparentemente devido a ausência de outras substâncias, as quais, estariam presentes nas dietas naturais desses insetos (Schlein, 1986).

Conforme podemos avaliar mediante alguns trabalhos relacionados, o número de animais sãos que se infectou mediante a realimentação de fêmeas infectadas é também variável para as diferentes associações flebotomíneo/**Leishmania** e fonte alimentar.

Lainson *et al.* (1977) obtiveram com 300 fêmeas de **L. longipalpis** infectadas com **Leishmania chagasi**, mediante alimentador tipo membrana, apenas 17 (5,6%) realimentadas, infectando 05 hamsters. Pozio *et al.* (1985) com 422 exemplares de **P. perniciosus** infectados com **Leishmania infantum** mediante membrana, obtiveram apenas 12 (2,9%) exemplares realimentados, infectando 02 ratos e, Ryan *et al.* (1987a), com 85 exemplares de **L. wellcomei** e **L. c. carrerai** infectados em hamsters/**Leishmania amazonensis**, obtiveram 09 (10,5%) exemplares realimentados. Destes, apenas 01 exemplar de **L. carrerai carrerai** transferiu parasitos para 01 hamster .

Diversos trabalhos relataram que algumas fêmeas de flebotomíneos realizaram repasto sangüíneo sobre animais por 02 ou 03 ocasiões (Endris *et al.*, 1984 Chaniotis, 1986) e, até por 04 ocasiões (Ward, 1977; Johnson & Hertig, 1961). A modalidade do experimento via picada é, entretanto, desalentadora pois, a maioria das fêmeas infectadas quando não morre no processo de oviposição, recusa-se a um segundo ou terceiro repasto sangüíneo (Killick-Kendrick *et al.* 1977).

As possíveis causas da recusa de repastos sanguíneos e da morte de fêmeas no processo de oviposição serão discutidas no item 5.4. de “mortalidade de elementos na colonização”.

Conforme sumarizado em Killick-Kendrick (1986) e no trabalho de Coelho *et al.* (1967a), estágios infectivos de ***Leishmania*** têm sido detectados na probóscida de flebotomíneos em diversas combinações inseto/***Leishmania***. Uma vez que muitos desses encontros e combinações traduziram-se em experimentos bem sucedidos na transferência de parasitos via picada, aventou-se a possibilidade de ser essencial a presença de estágios metacíclicos na probóscida dos insetos para tal transferência.

Diversos outros trabalhos de transmissão, entretanto, relatam a não detecção desses estágios na probóscida dos insetos (Coelho *et al.*, 1967a; Lainson *et al.*, 1977; Pozio *et al.*, 1985) tornando assim inconclusiva se sua presença naquele local seria necessária para ser transmitida a outros hospedeiros.

Enquanto que estudos de competência vetorial, utilizando-se de testes de suscetibilidade envolvendo flebotomíneo/***Leishmania*** complexo ***braziliensis*** são frequentes, testes de transmissão via picada com espécies desse complexo praticamente inexistem.

Hertig & McConnell (1963) não observaram nenhuma área de ulceração em humano onde 05 exemplares de ***L. gomezi*** experimentalmente infectados com ***Leishmania braziliensis*** se realimentaram.

Coelho *et al.* (1967b) ao infectarem ***L. longipalpis*** com ***Leishmania*** isolada de caso clínico compatível com leishmaniose tegumentar e, colocarem algumas fêmeas para realimentarem em 06 hamsters não infectados, não

observaram nenhum deles com lesões e/ou parasitos, após um período de 18 meses.

Ryan *et al.* (1987) ao colocarem 308 fêmeas silvestres de *L. wellcomei* para ingurgitarem em hamster, encontraram 01 exemplar infectado e, posteriormente, uma lesão nesse hamster, sendo o parasito identificado como *Leishmania braziliensi*. Rangel *et al.*, em sucessivas tentativas de transmissão experimental de *Leishmania braziliensis* por *L. intermedia*, ambos do município do Rio de Janeiro (RJ), não obtiveram êxito (comunicação pessoal).

A menor quantidade de experimentos envolvendo parasitos do complexo *braziliensis* reside possivelmente, na dificuldade de serem isolados de animais silvestres; perderem-se os cultivos após algumas passagens; produzirem leves infecções nos flebotomíneos; produzirem lesões transitórias em hamsters podendo desaparecer dentro de 03 meses e, muitas vezes, somente ser possível recuperar parasitos mediante cultivo de fígado e baço após muitos meses da inoculação (Ryan *et al.*, 1987)

Conforme podemos observar na Tabela 6, para experimentos de transmissão via picada, ficaram disponíveis para tentar novo repasto sangüíneo 39 fêmeas oriundas dos testes de suscetibilidade com a estirpe de *Leishmania braziliensis* M 2903. Assim, foram observados 03 exemplares realimentados, sendo que em 02 deles, foi detectado grande número de formas evolutivas de *Leishmania* em suas cárdias e proventrículos.

Para a estirpe 7312 estiveram disponíveis para novo repasto sangüíneo 43 fêmeas distribuídas da mesma forma acima citada. Foram observados que 02 exemplares se realimentaram e que, em apenas 01 deles foi detectado

pequeno número de formas evolutivas de *Leishmania* na cárdia e, estômago posterior e anterior, misturadas com grande número de bactérias.

Tanto para o grupo experimental da estirpe M 2903 como para o grupo da estirpe 7312, após 04 meses observando os 03 hamsters que serviram para o repasto sangüíneo para as fêmeas infectadas, em nenhum deles foi verificada lesão externa manifesta ou, após serem sacrificados, nenhuma forma semelhante à amastigota de *Leishmania* nos esfregaços corados ou em culturas de fígado e baço. Isto deveu-se, provavelmente, a uma eficiência diferenciada de seus sistemas imunes.

Observamos também que a maior parte das fêmeas disponíveis para realizar o segundo repasto sangüíneo não o fizeram. A inapetência transcorria dentro de um processo de definhamento que não raro, culminava com a morte dos insetos. Uma vez que a realimentação era permitida somente a partir do sétimo dia do primeiro repasto sangüíneo, e isto coincidia com o início da oviposição, muitas fêmeas morreram ainda durante essas posturas.

Embora a metodologia seguida nos experimentos via picada fosse considerada satisfatória, a artificialidade do ambiente laboratorial, a reutilização de uma mesma fonte sangüínea para os ingurgitamentos, a ausência de algum elemento químico ou físico que estimule o repasto sangüíneo, a possibilidade das formas promastigotas alterarem o comportamento alimentar dos insetos são fatores que devem ser considerados como influenciadores nesse tipo de experimento. Entretanto, a biologia especial de *Leishmania* complexo *braziliensis*, parece ser o fator determinante no sucesso dos experimentos via picada.

A transmissão pela picada é, geralmente, considerada como prova conclusiva de que uma espécie de flebotomíneo seja vetora de uma dada

Leishmania (Killick-Kendrick & Ward, 1981). Entretanto, podemos deduzir mediante os resultados da literatura anteriormente apresentados, que são inconclusivos quanto a definição da competência vetorial das espécies envolvidas, uma vez que as fontes sanguíneas não desenvolveram lesões manifestas ou não houve isolamento dos parasitos.

Uma outra variável de experimentos voltados à competência vetorial no contexto das leishmanioses, é representada por aqueles que objetivam testar a capacidade infectiva das formas flageladas desenvolvidas no intestino dos flebotomos. Esses experimentos, sendo realizados, mediante macerados dos conteúdos intestinais dos exemplares fêmeas e, inoculados via subcutânea ou intraperitoneal em animais suscetíveis.

Hertig & McConnell (1963) ao inocularem 16 ratos **Proechimys** com flagelados do conteúdo intestinal de 172 fêmeas de **L. sanguinaria**, **L. gomezi**, **L. panamensis** e **L. trapidoi** não obtiveram nenhum cultivo desses animais com **Leishmania**. Para 03 ratos brancos inoculados com conteúdo intestinal de 02 exemplares de **L. gomezi** e 01 de **L. sanguinaria**, com pesadas infecções nas cárdias e faringes, apenas 01 animal se revelou infectado por **Leishmania** em esfregaços corados após 07 dias de inoculação e, para 02 hamsters inoculados com 07 exemplares de **L. gomezi**, também com pesadas infecções nas cárdias e faringes, nenhum se revelou infectado após 29 e 50 dias da inoculação.

Uma vez que aqueles flebotomíneos foram infectados com promastigotas de cultura, mediante alimentador artificial tipo capilar, Williams & Coelho (1978) ponderaram que o processo reprodutivo das promastigotas no intestino das fêmeas inoculadas, poderia ser apenas continuação daquele iniciado nas culturas. Assim, essas promastigotas não seriam, necessariamente,

equivalentes àquelas que normalmente sofrem alterações morfológicas e fisiológicas sequencial nos flebotomíneos, possivelmente então, dificultando a implantação da doença nos animais testados.

Coelho & Falcão. (1962) infectaram exemplares silvestres de *L. longipalpis* em hamsters com *Leishmania* oriunda de caso clínico compatível com leishmaniose nodular difusa . Após 05 a 09 dias do repasto, macerados de 05 fêmeas com pesadas infecções nas cárdias e estômagos foram inoculados em 08 hamsters, obtendo-se 02 animais com formas amastigotas mediante esfregaços e colorações após 106 e 109 dias das inoculações.

Coelho *et al.* (1967b) relataram que inoculações de 24 hamsters com flagelados de *Leishmania mexicana*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani* e com 02 estirpes de *Leishmania braziliensis* tendo 02 a 12 dias de desenvolvimento nos tubos digestivos de *L. longipalpis* produziram em 14 hamsters, lesões com leishmanias após 26 e 109 dias. Uma vez que a positividade dos hamsters independeu do período de evolução dos protozoários nos insetos, os autores salientaram a possível ausência de formas especialmente infectantes nesses insetos.

Os primeiros experimentos de transmissão voltados à espécie *L. intermedia* foram realizados por Aragão (1922). Este, ao estudar um surto de leishmaniose no Rio de Janeiro conseguiu reproduzir uma úlcera no foçinho de cão ao inocular triturados de exemplares naturalmente infectados por formas flageladas, implicando assim esta espécie como participante na transmissão dos casos humanos verificados.

Chagas (1940) inoculou macerados de 07 exemplares infectados com *Leishmania chagasi* em 02 hamsters, sendo detectado em 01 deles, após 09

meses de inoculação, formas amastigotas mediante esfregaços corados do baço e fígado. Forattini *et al.* (1972b) inocularam 279 exemplares silvestres em 03 hamsters sendo que em um deles foram detectadas formas em amastigotas de ***Leishmania***, após 06 meses de evolução.

Os nossos experimentos de infectividade mediante macerados de exemplares silvestres de ***L. intermedia*** do Vale do Ribeira, conforme demonstrado na Tabela 7, dentre 67 hamsters inoculados, foram obtidos 42 com lesões nodulares sendo 20 (57,1%) para a estirpe de ***Leishmania braziliensis*** (M 2903) e 22 (68,7%) para a estirpe 7312 da mesma espécie, as quais, revelaram formas amastigotas. Os hamsters que não apresentaram lesões nodulares visíveis ou à apalpação e que tiveram suas culturas de baço e fígado negativas foram então , considerados como não infectados.

Considerando que todos os exemplares fêmeas de ***L. intermedia*** foram dissecados após 07 dias e, conseqüentemente, supondo que todas as formas flageladas estivessem relativamente uniformes quanto suas biológicas e morfologias, o fato de existirem hamsters inoculados e não infectados deveu-se, provavelmente, à maior eficiência de seus sistemas imunes.

5.3 - COLONIZAÇÃO DE *Lutzomyia intermedia*, s. lat. DO VALE DO RIBEIRA

- Número de colônias utilizadas

Na Tabela 8 é apresentado o número de colônias que foram utilizadas, necessário ao suprimento dos exemplares de primeira geração para os testes de suscetibilidade e testes de infectividade. Assim, para que se atendessem, de forma sequenciada as normas da metodologia proposta, foram utilizadas 10 colônias de *L. intermedia*. Destas, três colônias (1, 4 e 6) foram desenvolvidas até adultos de segunda geração (Tabela 9) e, apenas duas (4 e 6) até adultos de terceira geração (Tabela 10).

- Número de ovos utilizados

O número de ovos utilizado para iniciar cada colônia, deveu-se à variação da frequência com que as fêmeas silvestres de *L. intermedia* aportavam aos diversos pontos de coleta, ao número de fêmeas que se ingurgitavam no laboratório e da oviposição. Procurou-se assim, uniformizar esta quantidade inicial de ovos com um número médio de 200 ovos por pote utilizado (Tabela 8). Esse número médio foi considerado, a princípio, satisfatório tanto para o desenvolvimento dos experimentos como para se evitar excesso de ovos em relação ao tamanho dos potes.

Ward (1977) ao estabelecer uma colônia de *L. flaviscutellata* em Belém, PA, inicialmente tendo como recipiente para eclosão dos ovos, placas de

petri forradas com papel de filtro umedecido, utilizou cerca de 150 a 200 ovos por placa.

Killick-Kendrick *et al.* (1977b), para iniciarem uma colônia de *L. longipalpis*, a partir de exemplares capturados em Minas Gerais, Brasil, acondicionaram 1.726 ovos em pequenos recipientes denominados “potes de Hilton” com aproximadamente 80 a 120 ovos por pote.

Rangel *et al.* (1985) ao estabelecerem uma colônia de *L. intermedia* a partir de exemplares capturados no Rio de Janeiro, utilizaram 300 ovos por placa de petri forrada com papel de filtro umedecido. Posteriormente, Wermelinger *et al.* (1987) substituíram as placas de petri por potes plásticos forrados com gesso, onde acondicionaram até 1.500 ovos por pote.

Depreende-se assim, que a quantidade de ovos a serem utilizados para iniciar uma colônia de flebotomíneo varia enormemente em função da finalidade do estudo. Entretanto, a obtenção de um grande número de ovos viáveis e o acondicionamento desses ovos nos potes de criação de modo a favorecer um maior distanciamento entre os elementos, são fatores que influenciam suas eclosões e, conseqüentemente, a obtenção de maior número de adultos alados.

- Número de ovos ovipostos

Na Tabela 11 é apresentado a variação do número de ovos ovipostos pelas 125 fêmeas silvestres de *L. intermedia*, onde o menor número foi de 05 ovos/fêmea e o maior de 48 ovos/fêmea, com índice médio de 17,5 ovos/fêmea.

Para as 15 fêmeas de segunda geração foi alcançado um índice médio de 19,2 ovos/fêmea sendo a menor oviposição de 04 ovos/fêmea e a máxima de 45

ovos/fêmea. Para as 10 fêmeas de terceira geração , o índice médio foi de 17,1 ovos/fêmea , com oviposição menor e maior correspondendo a 06 e 31 ovos/fêmea respectivamente.

Os resultados por nós obtidos foram similares aos encontrados por alguns autores conforme podemos verificar nos trabalhos a seguir relacionados, embora a metodologia do acondicionamento das fêmeas não fosse uniforme em todos os trabalhos.

Mendoza *et al.* (1989), para exemplares silvestres de ***L. orestes***, quando acondicionadas isoladamente, encontraram índice médio de 20,4 ovos/fêmea, com menor oviposição de 08 ovos e maior de 32 ovos, em temperatura de 28,5°C e umidade relativa de 95%.

Chaniotis (1975) trabalhando com ***L. trapidoi***, acondicionada em grupos de 50 exemplares, encontrou índice médio de 24,2 ovos/fêmea e 25,5 ovos/fêmea para exemplares silvestres e de primeira geração respectivamente, tendo a temperatura alternado entre 23 a 27°C com umidade relativa estável em 80%.

Johnson & Hertig (1961), estudando a colonização de flebotomíneos neotropicais, relacionaram o número médio de ovos/fêmea obtido de algumas espécies de ***Lutzomyia*** . Para ***L. sanguinaria*** e ***L. ylephiletor*** foram obtidos em média 27 ovos/fêmea; para ***L. gomezi*** média de 29 ovos/fêmea e, para ***L. trapidoi*** , média de 21 ovos/fêmea.

Eldridge *et al.* (1963), trabalhando com ***Phlebotomus papatasi*** colonizado em laboratório, observaram que o índice médio de 30 ovos/fêmea à temperatura de 27°C, umidade relativa de 60% era indiferente quanto ao acondicionamento de 01 ou 02 fêmeas. Entretanto, salientaram que um grande

número de fêmeas nos potes poderia levar a competição pelo espaço de oviposição, resultando em um decréscimo na produção de ovos.

Ward (1977) em uma colônia de *L. flaviscutellata* em Belém , PA, estabelecida em temperatura que variou de 20° a 26°C e umidade relativa entre 90 e 98%, encontrou oviposição de 41,8 , 48,8 , 35,0 e 38,6 ovos/fêmea para o primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos gonotróficos, respectivamente, quando colocadas isoladamente nos potes de oviposição.

Killick-Kendrick *et al* (1977b) ao estabelecerem uma colônia de *L. longipalpis* à temperatura de 25°C e umidade relativa 95%, encontraram oviposição média de 50 ovos/fêmea, quando acondicionadas isoladamente.

Chaniotis (1986), estudando a atividade gonotrófica de *L. trapidoi*, à temperatura de 26,7°C e umidade relativa de 75% e fotoperiodismo natural, encontrou aumento do índice médio de 32,2 ovos/fêmea para 39,3 ovos/fêmea, quando nenhum macho estava presente no pote de oviposição.

Barretto (1940) encontrou para *L. intermedia* números variáveis como 02 e 54 ovos/fêmea. Para uma fêmea que realimentou após a primeira oviposição, observou-se um número de 40 ovos nesta primeira oviposição e 38 ovos após o segundo ingurgitamento.

Rangel *et al.* (1985) encontraram para *L. intermedia*, à temperatura de 25° e umidade relativa de 86%, acondicionada isoladamente, índice médio de 40,2 ovos/fêmea, 32,2 ovos/fêmea e 35,5 ovos/fêmea para as primeira, segunda e terceira gerações, respectivamente, com oviposição mínima de 04 e máxima de 106 ovos/fêmea

O número médio de ovos ovipostos, verificado em relatos de diversas colônias de diferentes espécies de flebotomíneos varia na faixa de 30 a 50

ovos/fêmea. Entretanto, esse número pode alterar consideravelmente em função de fatores como: espécie colonizada, condições do meio ambiente laboratorial e até quantidade de sangue ingerido (Lawyer *et al.*, 1991).

Rowton & Lawyer (1991) salientaram que a temperatura e umidade do ambiente são os estímulos exteriores reconhecidos como de efeito crítico em modelar as oviposições. Além disso, o fotoperiodismo, a disponibilidade de açúcar na dieta e o umedecimento da superfície de oviposição participam também como importantes fatores favorecedores do processo.

O uso de substâncias estimuladoras de oviposição na superfície da estrutura de oviposição, como fezes de coelho (Elnaiem & Ward, 1992), a presença ou ausência do macho junto à fêmea no pote de oviposição, o número de fêmeas nos potes e o tamanho desses potes (Killick-Kendrick *et al.*, 1977b) necessitam ainda de um maior número de estudos quanto à definir a influência positiva ou negativa na produção final dos ovos.

Embora nossa metodologia de criação de *L. intermedia* fosse baseada naquela de Rangel *et al.* (1985), não conseguimos obter índices de produção de ovos/fêmea semelhantes aos seus registros. O transporte dos insetos ao laboratório provocando algum nível de estresse, umidade e temperatura não totalmente favoráveis à população de *L. intermedia* do Vale do Ribeira poderiam estar entre os fatores não predisponentes a um melhor rendimento do índice médio de ovos/fêmea.

- Duração do ciclo de desenvolvimento

Estudos envolvendo as colonizações de flebotomíneos em laboratório, em geral, fazem menção ao tempo gasto para o desenvolvimento completo do ciclo evolutivo, bem como aos estágios intermediários. Conforme podemos observar pelos resultados encontrados por diversos pesquisadores, descritos em Forattini (1973), cada fase de desenvolvimento - ovo, larva e pupa - e o ciclo completo possuem períodos de tempo relativamente variáveis para diversas espécies.

- Período de desenvolvimento embrionário (ovos)

O período gasto para a eclosão dos ovos é variável de acordo com diversos fatores, sobressaindo, pela sua importância, a temperatura, sendo esta considerada como ótima quando situada entre 25° e 27°C. Seu efeito pôde ser observado quando Barretto (1941a, 1942) submetendo ovos de *L. whitmani* e *L. intermedia* à ação de diferentes graus de aquecimento, verificou ocorrência de um número menor de eclosões naqueles mais elevados. A 30°C praticamente não havia eclosões e, entre 4° e 6°C, verificava-se um retardamento no período de incubação

Johnson & Hertig (1961) trabalhando com diversas espécies de *Lutzomyia* do Panamá, a 25° e 26° C verificaram períodos de eclosão entre 9 a 10 dias e até mais de 30 dias para um mesmo lote de ovos de *L. panamensis*. Para *L. guyanensis*, espécie relacionada à *L. panamensis* e, provavelmente com os mesmos hábitos silvestres, as primeiras larvas foram obtidas 36 dias após oviposição.

Endris *et al.* (1982), à temperatura entre 22° a 28°C , relataram períodos que se estenderam de 15 a 40 dias para eclosão de alguns lotes de ovos em colônias de ***L. cruciata***, ***L. diabolica*** e ***L. vexator***.

Segundo Forattini (1973), mesmo na faixa compreendida entre os níveis ótimos de temperatura ou próximo a ela, às suas flutuações podem corresponder sensíveis variações no tempo de eclosão. Assim, além da temperatura, podem influir outros fatores poucos conhecidos. Alguns inerentes à própria espécie, de maneira que, em condições comparáveis, algumas apresentam períodos maiores ou menores que outras e, mesmo dentro da mesma categoria específica, tem-se acentuadas variações.

Além disso, evidências obtidas por diversos autores quanto às variações no tempo gasto para eclosões de ovos permitiram supor também a existência do fenômeno denominado diapausa, que se caracteriza pela parada do desenvolvimento embrionário até que estímulo apropriado o reate e se processe a eclosão (Johnson & Hertig, 1961; Schlein *et al.*, 1978).

- Período de desenvolvimento larval

O período de desenvolvimento larval é compreendido por quatro estádios que diferem sensivelmente entre si, no que concerne ao tamanho do elemento. O número de dias gasto para integralizar esses estádios, tem apreciável variabilidade dentro de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes. Assim, períodos curtos como de 09 a 18 dias verificados para ***L. oswaldoi*** contrapõem-se aos de 32 a 60 dias para ***L. monticola*** (Forattini, 1973).

Diversos fatores agindo isoladamente ou de forma combinada podem fazer com que seja aumentado ou diminuído o número de dias gastos para integralizarem estes períodos. Como fatores principais estão relacionados as variações das condições de umidade e de temperatura (Chaniotis, 1975,1986; Endris *et al.*, 1984; Killick-Kendrick *et al.*, 1977b), a qualidade da ração larval (Young *et al.*, 1981; Endris *et al.*, 1984), a maior ou menor ingestão do alimento larval (Killick-Kendrick *et al.*, 1977b; Mendoza *et al.*, 1982; Young *et al.*, 1981; Lawyer *et al.*, 1991), o canibalismo (Rangel *et al.*, 1985; Lawyer *et al.*, 1991), o fotoperiodismo (Schlein *et al.*, 1978) e a diapausa para larvas de quarto estágio (Lawyer *et al.*, 1991).

Uma vez que são elementos de difícil controle, daí possivelmente, resultaram as variações acentuadas que foram observadas quanto aos tempos gastos para completar esses períodos conforme descrição em Forattini (1973), ainda que os ambientes de laboratório fossem supostamente uniformes para as diversas gerações.

- Período de desenvolvimento pupal

O período de desenvolvimento pupal em condições favoráveis tem a duração entre uma e duas semanas e, à semelhança do que ocorre com outros estádios, a temperatura tem influência marcante no tempo pupal, com a duração desse período inversamente proporcional ao nível daquela, conforme verificado por Scorza *et al.* (1968).

Killick-Kendrick *et al.* (1977b) encontraram para *L. longipalpis* 88% e 96% de alados a partir de pupas nas primeira e nona gerações, respectivamente.

Para ***L. orestes*** foi verificado índice de 100% de produtividade (Mendonza *et al.*, 1989) e, para ***L. intermedia*** em quatro gerações, um índice médio de 84,3% de alados a partir de pupas (Rangel *et al.*, 1985).

Uma vez que as pupas não se alimentam e, sendo mais resistentes às variações do teor de umidade do que as larvas e ovos, podem sobreviver sem contato com água ou mesmo com 75-100% de umidade relativa, conforme relatos de Chaniotis & Anderson (1967). Assim, a maior resistência do elemento pupal às condições do meio ambiente e o curto período de tempo necessário à sua integralização, são fatores que possivelmente contribuíram para que fossem encontrados índices elevados de aproveitamento para adultos alados a partir de pupas.

- Ciclo de desenvolvimento para ***Lutzomyia intermedia***.

O primeiro pesquisador a acompanhar o ciclo evolutivo de ***L. intermedia*** em laboratório foi Bayma (1936), que à temperatura de 23° a 26°C e, desenvolvendo o estágio larval em câmara úmida, feita em placas de petri, obteve para incubação dos ovos período médio de 15 dias; para o período larval de 27 dias; período pupal de 08 dias e ciclo completo de 45 dias.

Castro (1937), mantendo as colônias em temperatura ambiente, no Rio de Janeiro, observou que a duração do ciclo da espécie ***L. intermedia*** foi de 52 dias e, em 1939 com outra colônia da mesma espécie, nas mesmas condições ambientais, foi de 36 dias.

Barretto (1940), em estudos sobre a biologia de ***L. intermedia*** em laboratório, obteve à temperatura entre 26° e 27°C o ciclo completo em 36 dias. Com

menores níveis de temperatura - 19,1° a 22,8°C - o desenvolvimento de ovo a adulto completou-se em 52 dias. Em 1942, o mesmo autor relatou também para *L. intermedia*, período mínimo de incubação dos ovos de 07 a 14 dias; larval de 15 a 33 dias; pupal mínimo de 06 a 14 dias e total de 21 a 61 dias.

Chagas (1940) quando estabeleceu uma colônia de *L. intermedia* à temperatura de 22° a 24°C, até a terceira geração obteve um período de desenvolvimento embrionário para ovos entre 07 a 09 dias; larval entre 27 e 28 dias e o pupal entre 07 a 09 dias. O ciclo de desenvolvimento de ovo à adulto alado completou-se em 43 dias.

Rangel *et al.* (1985) obtiveram para *L. intermedia*, à temperatura de 25° a 26°C com estágios desenvolvidos em placa de petri, nas quatro gerações analisadas, o ciclo de evolução em 37,8 dias. Para incubação dos ovos, média de 09 dias (máximo 14 e mínimo 06); desenvolvimento larvário em 21,5 dias (máximo 32 e mínimo 13) e período pupal em 7,2 dias (máximo 11 e mínimo 06).

Na Tabela 12 são apresentados, em número de dias, os períodos máximos e mínimos verificados durante o ciclo de criação nas 03 gerações das colônias de *L. intermedia* por nós estabelecidas à temperatura de 25°C, na total ou semi-obscuridade e utilizando-se de potes de criação forrados com gesso como recipientes para criação.

Para o desenvolvimento do ciclo completo foram gastos, em média, 39,6 dias com um período mínimo de 31 dias e máximo de 49 dias. Para as diferentes fases evolutivas foram obtidos os seguintes períodos médios: incubação dos ovos em 8,6 dias (máximo 13 e mínimo 05); período larval 24,3 dias e período pupal 7,6 dias (máximo 10 e mínimo 06).

Os resultados por nós obtidos, relativos à duração das diversas fases do ciclo evolutivo para *L. intermedia*, podem ser considerados similares aos encontrados por aqueles pesquisadores envolvidos com esta espécie, embora utilizassem diferentes graus de temperatura, teores de umidade, ração larvária, além de diferentes recipientes para o desenvolvimento das fases destes ciclo.

Deve-se salientar ainda que não observamos o fenômeno de diapausa, tanto a nível de larvas L₄ como para incubação dos ovos. Com referência aos ovos, a diapausa foi desconsiderada, uma vez que não foi detectada nenhuma porção de massa germinativa em seus interiores.

- Ciclo de desenvolvimento para outras espécies neotropicais

Os períodos de tempo gastos para desenvolver as diversas fases dos ciclos de criação para outras espécies de flebotomíneos também foram relatados em estudos mais recentes. Para *L. orestes* de ovo à adulto alado, à 28,5°C, houve uma variação de 49 a 54 dias (Mendoza *et al.*, 1989). Chaniotis (1986) em colônia de *L. trapidoi* à 26,7% verificou que o ciclo de desenvolvimento completou-se entre 33 e 47 dias.

Com relação à *L. anthrophora* à 24°C, o período de incubação dos ovos foi de 10 dias; o desenvolvimento larvário de 27,8 dias; período pupal de 11,5 dias e o ciclo evolutivo completo deu-se entre 47,5 e 51,5 dias (Endris *et al.*, 1984).

Conforme verificado na explanação anteriormente realizada sobre a influência de fatores como temperatura e umidade na duração das fases dos ciclos de desenvolvimento de flebotomíneos e, baseado nos números máximos e mínimos

de dias gastos para desenvolver as fases de criação de diferentes espécies de insetos, compiladas por Forattini (1973), pode-se concluir que os tempos gastos para integralizarem estes ciclos tornam-se variáveis em função de fatores conhecidos e, alguns ainda considerados obscuros.

- Rendimento das colônias

As nossas colônias de *L. intermedia*, estabelecidas a partir de 125 fêmeas silvestres que ovipuseram, dentre 306 fêmeas com potencial de oviposição, resultaram para iniciar cada colônia, em média 12,5 exemplares. Destes, foram obtidos 532 adultos alados (267 machos / 265 fêmeas) na primeira geração; 73 adultos (36 machos/ 37 fêmeas) na segunda geração e 32 adultos (16 machos/16 fêmeas) na terceira geração, conforme Tabelas 8, 9 e 10.

O rendimento geral das colônias para adultos alados de primeira geração correspondeu aos seguintes valores: 24,3% a partir de ovos, 41,6% a partir de larvas e 92,4% a partir de pupas. Para as segunda e terceira gerações, os rendimentos a partir de ovos foram 25,3 e 18,7%, a partir de larvas 38,0% e 28,0% e a partir de pupas 83,0% e 74,4% , respectivamente.

Com relação aos descendentes, verificamos que cada fêmea originou adultos alados que corresponderam à índices médios de 4,3 ; 4,8 e 3,2 exemplares nas primeira, segunda e terceira gerações, respectivamente.

O percentual de obtenção de adultos alados nas colônias de flebotomíneos é bastante variável conforme podemos observar pelos resultados de alguns trabalhos relacionados.

Chagas (1940) ao tentar estabelecer uma colônia de *L. intermedia* utilizando-se de ambiente de ar condicionado, com temperatura de 22° a 24°C e umidade superior a 80% conseguiu criar essa espécie, com dificuldade, até a terceira geração, pois os ovos postos pelas fêmeas desta geração e a maioria dos ovos da segunda geração não eclodiram.

Barretto (1940) obteve para *L. intermedia*, em temperatura entre 26° e 27°C, um rendimento geral de 70,5% (24 adultos a partir de 34 ovos) e, a temperatura de 19° a 22,8°C, um rendimento de 53% (19 adultos a partir de 17 ovos).

Rangel *et al.* (1985), para *L. intermedia*, obtiveram após 4 gerações, os seguintes índices médios de rendimentos: a partir de ovos 28,5%; a partir de larvas 46,6% e a partir de pupas 84,3%. A partir de uma fêmea, o índice médio de adultos alados obtidos foi de 10,2%, sendo que na terceira geração o rendimento apresentou valor mais elevado com 14,1% exemplares.

A colônia de *L. flaviscutellata* estabelecida por Ward (1977) produziu a partir de uma fêmea, 19 adultos na geração mais produtiva e 4,3 exemplares naquela de menor produtividade, além de um rendimento geral de 37% (99 adultos a partir de 288 ovos) para nove gerações estudadas.

Endris *et al.* (1984) com 15 gerações estabelecidas de *L. anthophora* a 24°C, conseguiram a partir de ovos um rendimento de 74,7%; a partir de larvas, 78,8% e a partir de pupas, 100%, com decréscimo destes valores, quando na ocorrência de aumento da temperatura.

Killick-Kendrick *et al.* (1977b) com 24 gerações estabelecidas de *L. longipalpis*, obtiveram a partir de 3.494 fêmeas um total de 24.758 adultos alados

sendo que uma fêmea produziu, em média, 07 exemplares. Obtiveram ainda um rendimento geral a partir de ovos de 22% (24.758 adultos para 108.935 ovos).

Mendoza *et al.* (1989) observaram para *L. orestes* a 28,5%, índice de rendimento geral a partir de ovos, de 16,0%; a partir de larvas, 25,8% e a partir de pupas alcançou 100%.

Os percentuais de rendimento das nossas colônias podem ser considerados similares aos verificados por Rangel *et al.* (1985), para produção de adultos a partir de pupas e, menores a partir de larvas e ovos. Com relação a Mendoza *et al.* (1989), o nosso índice para pupas foi menor em apenas 7,6%, porém bem mais expressivo quando comparados aos valores para larvas e ovos. Entretanto, para *L. anthophora* (Endris *et al.*, 1984) à temperatura de 24°C, os nossos valores foram menos expressivos, tanto a partir de ovos e larvas quanto a partir de pupas.

A diversidade das espécies e a origem geográfica dos flebotomíneos envolvidos nas diferentes colônias; as diferentes condições de manutenção e desenvolvimento quanto a temperatura, umidade e substrato utilizados nos potes de criação; a composição da ração larvária e habilidade manual dos operadores no manuseio dos potes contendo as larvas parecem constituir os principais fatores de influência na obtenção de maior ou menor número de adultos alados, quando se tenta estabelecer colônias desses insetos. Assim, a comparação entre resultados obtidos em diversos trabalhos torna-se bastante difícil e não totalmente satisfatório.

A perda de 673 elementos entre as fases de ovo a larva L₄, correspondendo a 52,6%, foi o principal fator, no nosso caso, de um menor rendimento para adultos alados na primeira geração.

- Proporção entre exemplares machos e fêmeas em colônias

Conforme apresentado na Tabela 8, foram obtidos 532 adultos alados nas primeiras gerações das 10 colônias estabelecidas. Destas, 49,8% corresponderam a 265 fêmeas e 50,2% corresponderam a 267 machos.

Com relação à proporção de machos e fêmeas em cada colônia de primeira geração, apenas naquelas de número 1, 5, 6 e 10 é que o número de machos obtidos suplantou ao de fêmeas (Tabela 8), tendo o mesmo acontecido em relação à colônia número 4 de segunda geração (Tabela 9) e a de número 6 na terceira geração (Tabela 10).

Conforme podemos avaliar pelos resultados de trabalhos selecionados, a proporção obtida entre exemplares machos e fêmeas em colônias de laboratório é variável segundo as espécies estudadas.

Endris *et al.* (1984) estudando a biologia de *L. anthrophora* sob diversas temperaturas, obtiveram à 20°C, para 19 adultos, 10 exemplares fêmeas e 09 machos. À temperatura de 24 °C, para 129 adultos, obtiveram 66 fêmeas e 63 machos e, à 28° e 29°C, entre 130 adultos, 73 fêmeas e 57 machos. Entretanto, à 32°C, entre 88 adultos nascidos, foi obtido uma maior quantidade de machos: 52 machos e 36 fêmeas.

Ward (1977) em colônia de *L. flaviscutellata*, na qual o período larvário desenvolveu-se entre 20° e 26°C, obteve para 2662 adultos uma proporção de 1,2 machos para cada exemplar fêmea.

Mendoza *et al.* (1989) com *L. orestes*, à 28,5°C, obtiveram 122 adultos, para os quais corresponderam 49 exemplares machos e 73 fêmeas.

Para a espécie *L. intermedia*, a proporção entre adultos alados machos e fêmeas também é variável conforme relato de alguns autores.

Barretto (1940) estudando a biologia de *L. intermedia*, obteve à temperatura entre 26° e 27°C, para 24 adultos, a proporção de 16 fêmeas e 09 machos e, com temperatura entre 19° e 22,8°C, para 09 adultos, 04 exemplares machos e 05 fêmeas.

Chagas (1940), com *L. intermedia* colonizada em primeira geração a 22° e 24°C, obteve para 3.492 adultos a proporção de 1.675 exemplares machos e 1.817 fêmeas. Essa proporção entre machos e fêmeas alternou-se para um ou outro sexo, em conformidade com o mês avaliado.

Rangel *et al.* (1985) para as 04 gerações de *L. intermedia* analisadas, à temperatura de 26°C, encontraram que o número de machos nascidos em cada geração foi superior ao de fêmeas, exceto na quarta geração com 47,4% de machos.

5.4 - MORTALIDADE DE ELEMENTOS NA COLONIZAÇÃO

Pode-se considerar que uma colônia de flebotomíneo desenvolve-se dentro de 05 fases principais constituídas pela oviposição das fêmeas; eclosão dos ovos; amadurecimento larvário; empupamento e emergência dos alados. Em todas estas fases, existe a possibilidade de ocorrer perda numerosa de elementos ocasionando, em decorrência, uma menor produtividade para adultos alados ou mesmo a inutilização total da colônia.

- Fêmeas silvestres que não ingurgitaram

Um fator associado à produtividade de uma colônia é representado pelo número inicial de fêmeas silvestres que, uma vez colocadas em contato com hamsters, realizariam o repasto sanguíneo. Se o ingurgitamento fosse realizado por todas as fêmeas, possivelmente haveria maior produção de ovos e melhor produtividade da colônia.

Conforme demonstrado na Figura 9, um dos fatores de queda na produtividade final para adultos alados foi representado pelo percentual de fêmeas silvestres que não se ingurgitaram em hamsters quando colocadas em ambiente de laboratório. De um total de 408 exemplares de *L. intermedia* habilitadas para realizarem o repasto sanguíneo em hamsters, 102 exemplares (25%) simplesmente não ingurgitaram, mesmo em mais de uma tentativa.

O índice de ingurgitamento de fêmeas silvestres é variável, possivelmente, em função da espécie animal disponível para o ingurgitamento e do ambiente de laboratório, conforme podemos verificar em relatos de alguns autores.

Chagas (1940) observou, para a espécie ***L. intermedia*** (silvestre e colonizada), variação do índice de ingurgitamento conforme o mês em que ocorreu o experimento. Assim, variações como de 66 (50,8%) fêmeas ingurgitadas dentre 130 habilitadas para o repasto sanguíneo até 02 (3,6%) fêmeas ingurgitadas dentre 58 habilitadas foram constatadas quando cães serviram como fonte de alimentação sanguínea.

Eldridge *et al.* (1963) para ***P. argentipes*** silvestres, em total obscuridade e, utilizando-se de cobaios para o repasto sanguíneo por 02 horas , constataram índice de ingurgitamento de no máximo 60%.

Hertig & Mc Connell (1963) obtiveram para exemplares silvestres de ***L. sanguinaria***, ***L. trapidoi*** e ***L. gomezi***, utilizando-se de alimentador artificial, tipo capilar, um índice de ingurgitamento maior para as duas primeiras espécies. Observaram ainda que mediante o uso deste tipo de alimentador, o número de exemplares silvestres que ingurgitaram foi maior que o número de exemplares colonizados para as mesmas espécies.

Carnevali & Scorza (1976) para ***L. townsendi*** silvestres, na semi obscuridade e, utilizando-se de hamsters para o repasto sanguíneo por 30 minutos, encontraram índice de ingurgitamento de 51,2% (43 fêmeas dentre 84 habilitadas para o repasto sanguíneo).

Estímulos como temperatura e umidade, possivelmente podem influir induzindo à realização da hematofagia. Presume-se que o abaixamento da temperatura e a concomitante elevação do teor de umidade constituam estímulos suficientes para dar início à atividade hematofágica (Forattini, 1973).

Quanto a luminosidade, estudos indicaram que a ação picadora é exercida, preferencialmente, nas horas escuras do dia (Hertig & Johnson, 1961;

Johnson & Hertig, 1961). Em laboratório, foi demonstrado seu exercício a qualquer hora do dia, mesmo em plena luz, desde que os insetos estivessem em íntima proximidade com a fonte alimentar adequada (Forattini, 1973), sendo esse aspecto verdadeiro para *L. longipalpis*. Entretanto, para *L. intermedia* parece que, preferencialmente, essa espécie realiza seus repastos sanguíneo durante a noite.

Com relação às preferências alimentares sanguíneas, sabe-se que os flebotomíneos neotropicais são bastante ecléticos, podendo sugar numerosos animais de sangue quente, inclusive o homem. Entretanto, diferenças geográficas, implicando na presença de populações da mesma espécie dotadas de preferências alimentares diferenciadas, de acordo com a região considerada, pode existir (Forattini, 1973).

A alimentação açucarada é outro fator que poderia influenciar no comportamento das fêmeas em relação ao hematofagismo. Chaniotis (1975) trabalhando com *L. trapidoi* concluiu que a alimentação açucarada foi pré-requisito em estimular o repasto sanguíneo e que o volume de solução ingerida influenciou no tempo para iniciar tal repasto sanguíneo e no volume de sangue ingerido.

Rangel *et al.* (1986a) observaram para *L. longipalpis* e *L. intermedia* que a solução açucarada não era fator imprescindível para as fêmeas aceitarem uma alimentação sanguínea, nem tampouco, atuaria como fonte estimuladora.

Mendonza *et al.* (1989) ao observarem que *L. orestes* colonizadas alimentavam em hamsters e, as que se alimentaram em sacarose a 50% recusavam a picar o animal, sugeriram então, que era necessário primeiro alimentá-las em fonte sanguínea e, posteriormente, oferecer a sacarose.

Os nossos resultados apresentando 102 exemplares silvestres (25%) que não realizaram o repasto sanguíneo, embora menores do que aqueles

anteriormente descritos, podem refletir algum item inadequado do experimento frente a esses estímulos, que de forma isolada, ou associada, poderiam ter impedido ou prejudicado esses exemplares de se ingurgitarem .

- Fêmeas que morreram no processo de oviposição

Outro fator importante de perda de elementos foi representado pelas fêmeas silvestres ingurgitadas que morreram no processo de oviposição. Dos 306 exemplares que realizaram o repasto sanguíneo, 73 (23,8%) morreram sem ovipor, enquanto que 108 (35,3%) exemplares morreram durante a oviposição. Assim, somente 125 exemplares (40,9%) é que foram utilizados para estabelecer as 10 colônias de *L. intermedia*.

A morte das fêmeas durante a oviposição, ou mesmo das que não ovipõem, é relatada como um dos obstáculos à manutenção de uma colônia produtiva. Esta queda de produtividade torna-se mais acentuada quando os locais de captura de exemplares silvestres encontram-se muito distantes dos laboratórios de pesquisa, dificultando a reposição dos exemplares fêmeas mortos.

Os percentuais de perda de elementos adultos no processo de oviposição é bastante variável. Assim, Eldridge *et al.* (1963) detectaram para *P. argentipes* e *P. papatasi* silvestres uma perda de 15,0% das fêmeas e, Ward (1977) para *L. flaviscutellata* observou índice de perda de 34,2%, enquanto que Killick-Kendrick *et al.* (1977b) para *L. longipalpis* silvestres detectaram índice de 29,3%.

Ryan *et al.* (1986) trabalhando com 21 espécies de flebotomíneos neotropicais da Serra dos Carajás (PA), assinalaram que para 2.387 fêmeas

habilitadas a ingurgitarem somente 1.265 (53,0%) exemplares o fizeram e destes, 549 (43,3%) é que produziram ovos.

Para a espécie *L. intermedia*, Barretto (1940) encontrou que 35% das fêmeas silvestres morreram sem ovipor e, Rangel *et al.* (1985), detectaram índice para as fêmeas mortas de até 41%.

A contaminação bacteriana proveniente do animal que serviu para o repasto sanguíneo ou do açúcar utilizado como fonte energética (Rowton & Lawer, 1991); a artificialidade do recipiente para oviposição (Barretto, 1940); a ausência de substâncias estimuladoras da oviposição (El Naiem & Ward, 1992a); o tamanho dos potes de oviposição (Killick-Kendrick *et al.*, 1977b) e presença de machos nesses potes (Chaniotis, 1986) são fatores admitidos como favorecedores de perda de exemplares fêmeas habilitadas para oviposição. Em nossos trabalhos, muitas fêmeas morreram aderidas à bolinha de algodão embebida no açúcar ou no papel de filtro umedecido.

Endris *et al.* (1984) estudando o comportamento alimentar de *L. anthophora* observaram que um fenômeno de ocorrência constante em cada geração era a aparente ruptura da integridade da membrana peritrófica formada a partir da ingestão sanguínea. Este sangue liberado espalha-se pelo organismo do inseto, em partes como o tórax, patas e antenas, resultando em alteração osmótica interna e/ou na liberação de enzimas digestivas, podendo ocasionar a morte de 75% dos exemplares afetados nas primeiras 24 horas após o ingurgitamento.

Embora o mecanismo de ruptura permaneça desconhecido, o autor salientou que é pouco provável que tal cifra de mortalidade ocorra durante a oviposição em populações silvestres.

- Perda de ovos

Na Figura 9, observamos que para o item - ovos que não eclodiram - foi verificado um percentual de perda de 41,6%, correspondendo a 913 ovos dentre os 2.192 disponíveis para eclosão.

A não eclosão de ovos também foi verificada por Chagas (1940) para a espécie *L. intermedia*, onde a maioria dos ovos de segunda e terceira gerações não eclodiu. Rangel *et al* (1985), para esta mesma espécie, encontraram índice médio de perdas, nas quatro gerações estudadas, de 38,8% e, Killick-Kendrick *et al.* (1977b), para *L. longipalpis*, detectaram índice de 5,0% para os ovos que não eclodiram e, usualmente índice de 100,0% naquelas posturas com número menor que 20 ovos.

Em nosso trabalho, um grande número de ovos transferidos para a superfície do gesso dos potes de criação, simplesmente não eclodiu, sendo assim considerado pela não visualização de alguma fenda para emergência de L₁. Estes ovos, após decorrer um número de dias além do aceitável para eclosão eram seccionados sendo então encontrados praticamente vazios de massa germinativa no seu interior indicando, possivelmente, um baixo índice de fecundidade dos exemplares silvestres.

A atuação dos fungos sobre os ovos, também fez com que muitos deles ficassem impedidos de eclodir, ainda que, a água utilizada para o umedecimento do gesso estivesse adicionada de composto anti fúngico. Após envolver os ovos com os filamentos micelianos era impossível limpá-los sem danificar a sua casca e, em consequência, a emergência larvária era prejudicada. Esta perda era realçada quando havia grande número de ovos aglomerados, distribuídos em pequenos lotes

na superfície do gesso. Esta aglomeração parecia favorecer ainda mais a proliferação do fungo sobre os ovos.

Outro fator de perda de elementos ocorreu durante o manuseio da colônia que era realizado com o intuito de renovar a ração, retirar os micélios desenvolvidos e as larvas mortas. Esta limpeza era feita com o auxílio de um extrator de tártaro raspando a superfície do gesso e, apesar do cuidado no manuseio, ainda assim, muitos ovos eram acidentalmente destruídos, com a conseqüente perda do elemento.

A transferência dos ovos aderidos aos substratos de oviposição para os potes de criação era realizada com o auxílio de um pincel. Embora os pêlos fossem bastante finos, não raro, alguns ovos eram danificados durante o processo.

- Perda de larvas

O período de desenvolvimento larvário é o mais longo de toda criação dos flebotomíneos. Decorrentes das grandes transformações biológicas sofridas pelos insetos, é um período suscetível à perda de um número maior de elementos.

Nesta fase de desenvolvimento de L_1 a L_2 , o índice de perda foi de 28,6%, correspondendo a 366 elementos dentre um total de 1.279. De L_2 até L_4 foi observado índice de perda de 33,6%, correspondendo a 307 elementos dentre 913 L_2 . Assim, a perda total de elementos nesta fase correspondeu a 606 elementos a partir de 1.279 ovos eclodidos (Figura 9).

Killick-Kendrick *et al.* (1977b) relataram para a espécie *L. longipalpis*, índice de perda para larvas de 7,0%, principalmente no estágio L_1 e, Endris *et al.* (1984) para *L. anthophora*, relataram perda de 21,2% das larvas. Índices mais

elevados foram detectados por Rangel *et al.* (1985) a nível de 44,8% para *L. intermedia* e por Mendoza *et al.* (1989) com *L. orestes*, quando obtiveram perda de 68,2% de suas larvas.

Diversos fatores contribuíram para a ocorrência do nosso índice de perdas. As larvas L₁ são mais delicadas em relação aos outros estágios e, muitas delas morreram por perda natural de vitalidade. Muitas quase não conseguiram sair inteiramente dos ovos e, outras saindo, pouco locomoviam, não se alimentavam mesmo quando a ração larvária era colocada próximo às suas cabeças.

Algumas larvas de aparência saudável, apareciam repentinamente mortas, apresentando coloração enegrecida em toda a extensão do intestino, não sendo possível determinar a causa: se por toxicidade do próprio gesso, da solução anti fúngica ou de algum nutriente da ração larvária. Para outras, as mortes naturais aconteceram principalmente durante as mudas ou ecdises.

O canibalismo foi muito pouco observado entre as larvas saudáveis, talvez devido à quantidade de ração disponível, além da menor aglomeração dessas larvas nos potes de criação. Muitas entretanto, se perderam migrando para fora dos potes, morrendo em contato com o papel de filtro umedecido nas caixas plásticas em que eram mantidas esses potes.

O fator principal a determinar a perda de elementos na fase larvária deveu-se ao desenvolvimento de fungos nos potes de criação. A associação de umidade permanente no gesso dos potes, ração larvária e temperatura a 25°C, propiciaram uma grande proliferação de filamentos micelianos a partir dos grãos da ração, ainda que, a água mineral, utilizada para o umedecimento do gesso desses potes, estivesse adicionada de composto anti fúngico.

O excesso de filamentos micelianos crescidos a partir dos grãos da ração e sua irradiação por toda a superfície do pote permitia que um grande número de larvas ficassem enroladas nos micélios, com imobilização e morte dos elementos. Outras larvas, uma vez que moviam entre os grãos da ração, tinham o tegumento e a cápsula bucal impregnados com estes grãos, terminando por favorecer o crescimento de fungos em grande parte do corpo. Quando nas cápsulas bucais, as larvas eram impedidas de alimentar, o que em decorrência, ocasionavam suas mortes.

Durante o manuseio das colônias para a execução da limpeza dos potes, muitas larvas eram acidentalmente seccionadas com a conseqüente perda do elemento.

- Perda das pupas

O período de desenvolvimento pupal pode ser considerado aquele em que ocorre a menor porcentagem de perda entre os elementos, conforme relatos sobre colônias estabelecidas para diferentes espécies de flebotomíneos.

Mendoza *et al.*(1989) com ***L. orestes*** e Endris *et al.*(1984) com ***L. anthophora*** não verificaram perda de pupas em suas colônias. Entretanto, Killick-Kendrick *et al.*(1977b) relataram perda de pupas a nível de 0,8% em sua colônia de ***L. longipalpis*** e, Rangel *et al.* (1985), para ***L. intermedia***, nas quatro gerações, detectaram índices médio de perda de 15,7%.

Nesta fase de desenvolvimento, o índice de perda, por nós verificado, foi de 7,6%, correspondendo a 44 elementos dentre 576 que empuparam (Figura 9).

O fator principal que motivou este índice de perda deveu-se, na maioria das vezes, ao prolongamento do número de dias necessários à emergência dos alados, favorecendo o crescimento de filamentos micelianos no corpo pupal.

Em alguns elementos ocorria um enegrecimento de toda a estrutura pupal, determinando a sua perda natural e, em outros casos, o elemento era perdido devido à sua emergência apenas de forma parcial.

As diversas metodologias empregadas no estabelecimento de uma colônia de flebotomíneo e a variação nos índices relativos às produtividades decorrentes dessas metodologia afetam, em maior ou menor grau, os resultados finais obtidos a partir de objetivos propostos em estudos voltados à biologia desses insetos ou mesmo a continuidade de muitos experimentos.

Conforme depreendemos da literatura pertinente à colonização de flebotomíneos onde diversos procedimentos foram eliminados e outros simplificados, permitindo a obtenção de descendentes em maior número, mais saudáveis e mais tolerantes às condições físicas de laboratórios, a colonização de muitas espécies desses insetos permanece difícil de ser mantida por muitas gerações, extremamente laboriosa e, às vezes, necessitando de vários profissionais na manutenção de uma única colônia além de freqüente reintrodução de exemplares silvestres.

Entretanto, os resultados por nós obtidos relativos à espécie *L. intermedia*, nos permitiu concluir pela viabilidade de colonização dessa espécie de flebotomíneo com propósitos de estudos experimentais.

6 - CONCLUSÕES

6.1- AVALIAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS DA TRANSMISSÃO POR *Lutzomyia intermedia*, s. lat. NO VALE DO RIBEIRA.

- A negatividade de infecção natural em *L. intermedia* por *Leishmania* sp, torna inconclusiva a existência de similaridade taxonômica entre *Leishmania* infectante de inseto e população humana, segundo os postulados de Killick-Kendrick & Ward (1981).

- Em nosso trabalho, não realizamos experimentos específicos para avaliar o caráter antropofílico de *L. intermedia*. Entretanto, muitos exemplares foram capturados quando de suas tentativas para ingurgitarem-se nos indivíduos que realizavam as coletas noturnas. Assim, tendo como suporte a literatura consultada, concluímos que essa espécie no Vale do Ribeira possui caráter antropofílico e, em decorrência, potencial para realizar a transferência de *Leishmania* para a população humana.

- Pela literatura disponível, observamos que no Vale do Ribeira houve superposição entre as áreas de ocorrência dos casos de leishmaniose e uma determinada espécie de flebotomíneo, representada na maioria das vezes, por *L. intermedia*. Uma vez que a transmissão parece ocorrer nos domicílios e peridomicílios com essa espécie apresentando-se em maior densidade nesses locais e, aliado a seu comportamento endofílico e atividade hematofágica noturna, concluímos que existem dados suficientes para fortalecer a capacidade vetorial de *L. intermedia*. Pelo menos é

dela que se reúne o maior número de atributos necessários para realizar a transmissão da parasitose em ambientes antrópicos nessa região do Estado de São Paulo.

6.2- ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM *Lutzomyia intermedia*, s.lat. DO VALE DO RIBEIRA.

- Os percentuais de positividade de 76,1% e 72,0% para a associação *L. intermedia* (silvestre) / *Leishmania braziliensis* (M2903) e *L. intermedia* (silvestre) / *Leishmania braziliensis* (7312) demonstraram espectros similares de suscetibilidade dos exemplares com idade cronológica diferenciada, frente a duas diferentes estirpes de *Leishmania braziliensis*. Para os insetos colonizados, os índices de positividade de 67% frente à estirpe M2903 e de 73% frente à estirpe 7312 demonstraram da mesma forma essa suscetibilidade mesmo quando os insetos tinham idade cronológica conhecida.

- Após a digestão do repasto sangüíneo infectivo, as fêmeas da espécie *L. intermedia* possuem as condições fisiológicas e bioquímicas adequadas, de modo a favorecer ou, pelo menos, a não impedir o ancoramento de formas evolutivas de *Leishmania braziliensis* no intestino (piloro e íleo) com migração dos flagelados para a cárdia, além da infecção do proventrículo. Este fato realça a condição de *L. intermedia* em ser hospedeira compatível para o desenvolvimento de formas evolutivas de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

- Embora não tenhamos conseguido detectar a presença de amastigotas nos hamsters picados por *L. intermedia*, ainda assim, pelo fato de ter ocorrido um segundo ingurgitamento por 03 fêmeas infectadas, pode-se sugerir que essa espécie tenha potencial suficiente para se infectar e transmitir *Leishmania (V.) braziliensis*.

- A obtenção de um número expressivo de hamsters infectados (n=42) nos experimentos, via macerado, permitiu-nos concluir que a espécie *L. intermedia*, além de não impedir o desenvolvimento progressivo das diversas fases evolutivas de *Leishmania* nos seus tratos digestivos, algumas formas flageladas ainda adquiriram ou mantiveram infectividade suficiente para, uma vez inoculadas experimentalmente em animais suscetíveis, evoluírem à forma patogênica característica encontrada em lesões desses animais.

6.3- COLONIZAÇÃO DE *Lutzomyia intermedia*, s. lat. DO VALE DO RIBEIRA.

- O desenvolvimento do ciclo completo da colonização de *L. intermedia* deu-se, em média, em 39,6 dias. A incubação de ovos em 8,6 dias, período larval em 24,3 dias e período pupal em 7,6 dias .

- O rendimento das colônias para adultos alados de primeira geração foi de 24,3% a partir de ovos, 41,6% a partir de larvas e 92,4% a partir de pupas.

- Os maiores percentuais de perda de elementos na colonização ocorreram para fêmeas que morreram na oviposição com 35,3% (n=306), ovos que não eclodiram com 41,6% (n=2192) e morte de larvas no primeiro estágio com 33,6% (n=913).

- Concluimos finalmente que embora não tenha sido detectado infecção natural em exemplares de *Lutzomyia intermedia*, *s.lat.* da região do Vale do Ribeira (SP), impedindo um correlacionamento à sua capacidade vetorial, outros determinantes epidemiológicos considerados aliados aos resultados dos estudos experimentais por nós realizados realçam, significativamente, a suspeita da sua competência vetorial. Assim, nos é sugerido que essa espécie possui as condições fisiológicas necessárias de modo a favorecer o desenvolvimento de formas infectivas de *Leishmania* e, em decorrência, participarem dos ciclos domésticos e/ou naturais da leishmaniose nessa região do país. Além disso, reiteramos a viabilidade da colonização dessa espécie de flebotomíneo com propósito de estudos experimentais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. & THEODOR, O. Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. *Ann. Rev. Entomol.*, **2**: 203-226, 1957.

AGUIAR, G.M. ; MEDEIROS, W.M.; SANTOS , T.G.; KLEIN, A.F.L.; FERREIRA, V.A. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous leishmaniasis in Paraty , littoral of Rio de Janeiro State (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **88**:339-340 , 1993.

ARAGÃO, H. de B. Transmissão da leishmaniose no Brazil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Bras. Med.*, **36**:129-130, 1922.

BARRETTO, M.P. Observações sobre a biologia do *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera:Psychodidae) em condições experimentais. *An. Fac. Med. Univ. S.Paulo*, **16**:143-157, 1940.

BARRETTO, M.P. Sobre a astenobiose do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Diptera:Psychodidae). *Rev. Bras. Biol.*, **1**:305-310, 1941.

BARRETTO. M.P. Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Diptera : Psychodidae) em condições experimentais. *Papéis Dep. Zool. S.Paulo*, **13**: 87-100, 1941a.

BARRETTO, M.P. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). Tese. São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1942.

- BARRETTO, A.C.; VEXENAT, J.A.; PETERSON, N.E. The susceptibility of wild caught sand flies to infection by a subspecies of ***Leishmania mexicana*** isolated from ***Proechimys iheringi denigratus*** (Rodentia, Echimyidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 235-236, 1986.
- BASTIEN, P. Comparison of *Leishmania* infections in sandflies fed with two types of feeders. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **86**: 309-310, 1992.
- BASTOS, J.M.C.M.G. Observações à margem de surto epidêmico de Leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira, (São Paulo) . *Bol. Div. Nac. Sanit.*, **37**: 73-86, 1978.
- BAYMA, T. Biologia de ***Phlebotomus intermedius***. *Ann. Paulist. Med. Cir.*, **32**: 213-216, 1936.
- BEACH, R.; KIILU, G.; HENDRICKS, L.; OSTER, C.; LEEUWENBURG, J. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of ***Leishmania major*** to man by the bite of a naturally infected ***Phlebotomus duboscqi***. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**: 747-751, 1984.
- BEACH, R.; KIILU, G.; LEEUWENBURG, J. Modification of sand fly biting behavior by ***Leishmania*** leads to increased parasite transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 278-282, 1985.
- BERQUÓ, E.S.; DE SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. Bioestatística . 1ª ed. rev. São Paulo : EPU, 1981.

- BIAGI, F.F.; DE BIAGI, A.M. DE B.; BELTRAN, H.F. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmissor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Med. Mex.*, **9 -12**: 267-272, 1965.
- CARNEVALI, M. & SCORZA, J.V. Infección experimental de *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) con una cepa venezolana de *Leishmania brasiliensis*. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.*, **16**: 333-343, 1976.
- CASANOVA, C.; MAYO, R.C.; RANGEL, O.; MASCARINI, L.M.; PIGNATTI, M.G.; GALATI, E.A.B.; GOMES, A.C. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the valley of the Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.*, **35** (suppl. 1): 77-84, 1995.
- CASTRO, G.O. Sobre um processo de cultura de flebótomos. Nota prévia. *Soc. Biol. Rio de Janeiro*. Sessão de 8 de outubro de 1937.
- CHAGAS, A.W. Criação de flebotomos e transmissão experimental da leishmaniose visceral americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **35**: 327-333, 1940.
- CHANIOTIS, B.N. & ANDERSON, J.R. Age structure, populations dynamics and vector potencial of *Phlebotomus* in Northern California. I- Distinguishing parous from nulliparous flies. *J. Med. Entomol.*, **4**: 251-254, 1967.
- CHANIOTIS, B.N. A new method for rearing *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with observations on its development and behavior in the laboratory. *J. Med. Entomol.*, **12**: 183-188, 1975

- CHANIOTIS, B.H. Successful colonization of the sand fly *Lutzomyia trapidoi* (Diptera:Psychodidae), with enhancement of its gonotrophic activity. *J. Med. Entomol.*, **23**:163-166, 1986.
- CHASE, M.W. Animal handling 4. Mice. *In*: Williams, C.A. and Chase, M.W. Ed.. *Methods in immunology*, New York, Academic Press, 1967. V.I, p.283-293.
- COELHO, M.V. & FALCÃO, A.R. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. I- Transmissão pela inoculação de triturados de *Phlebotomus longipalpis* experimentalmente infectados. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**: 159-162, 1962.
- COELHO, M.V. & FALCÃO, A.R. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II- Transmissão de *renei* amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* e de *Phlebotomus renei*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**: 220-224, 1962a.
- COELHO, M.V. Pesquisas recentes sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Bras. Malariol. & Doenças Trop.*, **16**: 13-18, 1964.
- COELHO, M.V. & COUTINHO-ABATH, E. Experimental cutaneous leishmaniasis. 1- Infection of albino mice and Syrian hamsters by *Leishmania mexicana*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **7**: 136-144, 1965.
- COELHO, M.V.; FALCÃO, A.R.; FALCÃO, A.L. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebótomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. I- Evolução de *L. braziliensis* em flebótomo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **9**: 177-191, 1967.

- COELHO, M.V.; FALCÃO, A.R.; FALCÃO, A.L. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebótomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. II- Ciclo vital de *L. tropica* em *L. longipalpis* e *L. renei*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **9**: 192-196, 1967a.
- COELHO, M.V.; FALCÃO, A.R.; FALCÃO, A.L. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebótomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. V- Infectividade de leptomonas evoluindo no flebótomo e experiências de transmissão de leishmanioses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **9**: 367-373, 1967b.
- DEDET, J-P. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Ann. Inst. Pasteur*, **4**: 3-25, 1993.
- DOMINGOS, M.F. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1981 a 1995. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da USP, 85 pp. 1997.
- DOUGHERTY, M.J.; HAMILTON, J.G.C.; WARD, R.D. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med. Vet. Entomol.*, **7**: 219-224, 1993.
- ELDRIDGE, B.F.; SCANLON, J.E.; ORENSTEIN, I.M. Notes on the laboratory rearing of sand flies (Diptera:Psychodidae). *Mosquito News*, **23**:215-217, 1963.

- ELNAIEM, D.A. & WARD, R.D. Oviposition attractants and stimulants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **29**: 5-12, 1992.
- ELNAIEM, D.A. & WARD, R.D. The thigmotropic oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) to crevices. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **86**: 425-430, 1992a.
- ENDRIS, R.G.; PERKINS, P.V.; YOUNG, D.G.; JOHNSON, R.N. Techniques for laboratory rearing of sand flies (Diptera:Psychodidae). *Mosquito News*, **42**:401-407, 1982.
- ENDRIS, R.G.; YOUNG, D.G.; BUTLER, J.F. The laboratory biology of the sand fly *Lutzomyia anthophora* (Diptera : Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **21**:656-664, 1984.
- FALQUETO, A.; GRIMALDI Jr., G.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; DEANE, L.M. *Lutzomyia gasparviannai*, Martins, Godoy & Silva, 1962, probable vector of *Leishmania mexicana ssp.* in Viana municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **80**: 497, 1985.
- FALQUETO, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no Estado do Espírito Santo. Tese de doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 84pp. 1995.

- FORATTINI, O.P. & DOS SANTOS, M. R. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz e Neiva 1912, por formas em Leptomonas, em um foco de Leishmaniose tegumentar americana. *Arq. Hig.*, **17**: 171-174, 1952.
- FORATTINI, O.P. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peri-domiciliares, no Estado de São Paulo. *Arq. Fac. Hig.*, **7**: 157-168, 1953.
- FORATTINI, O.P. Algumas observações sobre a biologia de *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) em região da Bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. Saúde Públ.*, **8**:15-136, 1954.
- FORATTINI, O.P. & OLIVEIRA, O. Um foco de leishmaniose tegumentar na zona sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Fac. Hig. Saúde Pública, Univ. São Paulo*, **11**: 23-34, 1957.
- FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **2**: 195-203, 1960.
- FORATTINI, O.P. *Entomologia médica*. São Paulo , Ed. Univ. São Paulo, 1962. v.1.
- FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D.B.G.; FERREIRA, O.A. Nota sobre um foco de leishmaniose tegumentar na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **6**: 103-105, 1972.
- FORATTINI,O.P.; PATTOLI,D.B.G.; RABELLO,E.X.; FERREIRA,O.A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, **6**: 255-261, 1972a.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, O.A. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **6**: 431-433, 1972b.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B. G.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, O.A. Notas e informações / Notes and information . Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **7**: 181-184, 1973.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; SERRA, O.P.; ROCHA E SILVA, E.O.; RABELLO, E.X. Nota sobre leishmaniose tegumentar no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **7**: 447-452, 1973a.

FORATTINI, O.P. *Entomologia médica*. São Paulo Ed. Univ. São Paulo , 1973. V.4. pp. 120-197.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; SERRA, O.P.; COTRIM, M.D.; GALATI, E.A.B.; BARATA, J.M.S. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **10**: 31-43, 1976.

FORATTINI, O.P.; GOMES, A.C.; GALATI, E.A.B.; RABELO, E.X.; IVERSSON, L.B. Estudos ecológicos sobre mosquitos *Culicidae* no sistema da Serra do Mar, Brasil. 1- Observações no ambiente extradomiciliar. *Rev. Saúde Pública*, **12**: 297-325, 1978.

FORATTINI, O.P. *Ecologia , epidemiologia e sociedade* . São Paulo, Ed. Univ. São Paulo, 1992. pp. 239-353.

FUNDAÇÃO SEADE. O novo retrato de São Paulo: avaliação dos primeiros resultados do censo demográfico de 1991. São Paulo. 1992.

GEMETCHU, T. The biology of a laboratory colony of *Phlebotomus longipes* Parrot & Martin (Diptera:Phlebotominae). *J. Med. Entomol.*, **12**: 661-671, 1976.

GIORGIO, S. ; DEBERALDINI, E.R.; PACHECO, R.S.; PIRES, M.Q.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; CORDEIRO, N.; MAGALHÃES, L.A.; CINTRA, M.L.; GUIMARÃES, N.S.N.; STEDILE, N.M.G.M. Casos de leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos municípios de Cosmópolis e Indaiatuba - região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **29**: 419-424, 1996.

GOMES, A. C.; RABELLO, E. X.; SANTOS, J. L. F.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos a ecótopos artificiais com referência especial a *Psychodopygus intermedius*. *Rev. Saúde Pública*, **14**: 540-556, 1980.

GOMES, A. C.; RABELLO, E. X.; SANTOS, J. L. F.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 2. Ecótopo artificial como abrigo de *Psychodopygus intermedius* e observações sobre alimentação e reprodução sob influência de fatores físicos naturais. *Rev. Saúde Pública*, **16**: 149-159, 1982.

- GOMES, A. C. ; RABELLO, E. X.; SANTOS, J.L. F.; GALATI, E.A.B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. *Rev. Saúde Pública*, **17**: 23-30, 1983.
- GOMES, A. C.; SANTOS, J. L. F.; GALATI, E. A. B. Ecological aspects of american cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of the S. Paulo State, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, **20**: 280-287, 1986.
- GOMES, A.C. & GALATI, E.A.B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 5. Estratificação da atividade espacial e estacional de phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**: 467-473, 1987.
- GOMES, A. C. & GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, **23**: 136-142, 1989.
- GOMES, A. C.; BARATA, J. M.; ROCHA E SILVA, E.O.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, **31**: 32-39, 1989.

- GOMES, , A.C.; OTTATI, S.M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; YAMAMOTO, Y.I. Active transmission of ***Leishmania braziliensis*** in the Serra de Mar forest, São Paulo, Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **83**: 193, 1989a.
- GOMES, A. C.; COUTINHO, S. G.; PAIM, G. V.; OLIVEIRA, S. M. O.; GALATI, E. A. B.; NUNES, M. P.; CAPINZAIKI, A. N.; YAMAMOTO, Y. I.; ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8. Avaliação da atividade enzoótica de ***Leishmania (Viannia) braziliensis***, em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **32**: 105-115, 1990.
- GOMES, A. C.; YAMAMOTO, Y. I.; CAPINZAIKI, A. N.; AMARAL, N. M. M.; GUIMARÃES, A. J. G. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 9. Prevalência / incidência da infecção humana nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **34**: 149-158, 1992.
- GOMES, A.C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An. Bras.Dermatol.*, **67**: 55-60, 1992.
- GOMES, A. C. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **89**: 457-460, 1994.
- GOMES, A. C. ; GALATI, E.A.B.; CASANOVA, C.; DOMINGOS, M.F.; MARQUES, G.R.A.M.; NEVES, V.L.F.C. Analysis of the geographical distribution of leishmaniasis vectors in the State of São Paulo, Brazil. *Bol. Malariol. Saneamento Ambiental*, **35** (Suppl. 1): 143-146, 1995.

- GOMES, A.C.; NEVES, V.L.F.C. Estratégias e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo . *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998. (PRELO)
- GRIMALDI, G. JR.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **41**: 687-725, 1989.
- HASHIGUCHI, Y.; CHILLER, T.; INCHAUSTI, A.; DE ARIAS, A.; KAWABATA, M.; ALEXANDER, J.B. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *Ann.Trop. Med. Parasitol.*, **86**: 175-180, 1992.
- HENDRICKS, L. & WRIGHT, N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider' s *Drosophila* medium. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**: 962-964, 1979.
- HERTIG, A.T.; HERTIG, M. A technique for the artificial feeding of sandflies (*Phlebotomus*) and mosquitoes. *Science*, **65**:328-329, 1927.
- HERTIG,M. & JOHNSON, P.T. The rearing of *Phlebotomus* sandflies. I. Technique. *Ann. Ent.omol. Soc. Amer.*, **54**:753-764, 1961.
- HERTIG,M. & MCCONNEL,E. Experimental infection of panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Expl. Parasitol.*, **14**: 92-106, 1963.
- JARAMILLO,C.; TRAVI,B.L.; MONTOYA,J. Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. *Med. Vet.Entomol.*, **8**: 1-7, 1994.

- JOHNSON, P.T. & HERTIG, M. The rearing of ***Phlebotomus*** sandflies (Diptera : Psychodidae) I. Development and behavior of panamanian sandflies in laboratory culture. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **54**: 764-775, 1961.
- JOHNSON, P.T.; MCCONNELL, E.; HERTIG, M. Natural infections of Leptomonad flagellates in Panamanian ***Phlebotomus sandflies***. *Exp.Parasitol.*, **14**: 107-122, 1963.
- KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.J.; READY, P.D.; MOLYNEUX, D.H. ***Leishmania*** in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of ***Leishmania mexicana amazonensis*** to hamsters by the bite of experimentally infected ***Lutzomyia longipalpis***. *Proc. R. Soc. Lond.B.*, **196**: 105-115, 1977.
- KILLICK-KENDRICK,R.; MOLYNEUX,D.H.; HOMMEL,M.; LEANEY,A.J.; ROBERTSON,E.S. ***Leishmania*** in phlebotomid sandflies V. The nature and significance of infections of the pylorus and ileum of the sandfly by leishmaniae of the ***braziliensis complex***. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **198**: 191-199, 1977a.
- KILLICK-KENDRICK, A.; LEANEY, A.J.; READY, P.D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of ***Lutzomyia longipalpis*** (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **13**: 429-440, 1977b.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology of ***Leishmania*** in phlebotomine sandflies. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A. Ed. *Biology of Kinetoplastida* . London/New York, Academic Press, 1979. V.II, pp. 396-460.
- KILLICK-KENDRICK, R. & WARD, R.D. Ecology of ***Leishmania***. *Parasitology*, **82**: 143-152, 1981.

KILLICK-KENDRICK, R. The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly.

J. Royal Army Med. Corps, **132**: 134-140, 1986.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med.*

Vet. Entomol., **4**: 1-24, 1990.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of ***Leishmania***

chagasi, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly

Lutzomyia longipalpis. *Nature*, **266**: 628-630, 1977.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. ***Leishmania*** in phlebotomid sandflies: VI.

Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the

Leishmania mexicana and ***L. braziliensis*** complexes. *Proc. R. Soc. London.*

B., **199**: 309-320, 1977a.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-

America. *Nature*, **273**: 595-600, 1978.

LAINSON, R.; READY, P.D.; SHAW, J.J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On

the taxonomic status of ***Leishmania peruviana***, causative agent of peruvian

"uta", as indicated by its development in the sandfly, ***Lutzomyia longipalpis***.

Proc. R. Soc. London. B., **206**: 307-318, 1979.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, Classification and geographical distribution.

In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. Ed. *The leishmaniasis in biology and*

medicine, London, Academic Press, 1987. V.I, pp.1-120.

- LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COUTERNAY, O.; SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T. Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**:135-137, 1990.
- LAINSON,R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; DE SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, **89**: 435-443, 1994.
- LAWYER, P.G. & YOUNG, D.G. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from United States. *J. Med. Entomol.*, **24**: 458-462, 1987.
- LAWYER, P.G.; ROWTON, E.D.; PERKINS, P.V.; JOHNSON, R.N. Recent advances in laboratory mass rearing of phlebotomine sand flies. *Parassitologia*, **33** (suppl. 1):361-364, 1991.
- LEWIS, D.J. ; WARD, R.D. Transmission and vectors . In: Peters, W. and Killick-Kendrick, R. Ed. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London, Academic Press, 1987. V.I, pp. 235-257.
- MACHADO, M.I.; MILDER, R.V. Isolamento e identificação de *Leishmania braziliensis braziliensis* de casos humanos e cães domésticos do Estado de São Paulo. *R. Cent. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia*, **2**:9-21, 1986.

- MARCONDES, C.B. A redescription of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **91**: 457-462, 1966.
- MENDOZA, J.L.; GILI, T.A.; NEGRIN, E.M.; COTERA, J.L.P.M. Cultivo de *Lutzomyia Orestes* (Diptera:Psychodidae) a partir de una poblacion cavernicola de la Provincia la Habana. *Rev. Cub. Med. Trop.*, **41**:76-85, 1989.
- MODI, G.B. & TESH, R. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera:Psychodidae) in the laboratory. *J.Med. Entomol.*, **20**:568-569, 1983.
- MOLINEUX, D.H.; MOORE, J.; MAROLI, M. Sugars in sandflies. *Parassitologia*, **33** (supl. 1): 431-436, 1991.
- NAPIER, L.E. The artificial feeding of sandflies. *Indian J. Med. Res.*, **18**:699-706, 1930.
- PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania brasiliensis*. *Rev. Biol. Hig.*, **10**: 139-142, 1940.
- PESSÔA, S. B. & PESTANA, B. R. Sobre a disseminação da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. Resultado de um inquérito realizado nos "Centros de Saúde" do Interior. *Folha Méd.*, **21**: 20-23, 1940.

PESSÔA, S.B. & COUTINHO, J.O. Infecção natural e experimental dos flebótomos pela ***Leishmania braziliensis***, no Estado de São Paulo (1). *O Hospital*, **20**: 25-35, 1941.

PETERS, W. Heterogeneity of cutaneous leishmaniasis with emphasis on the Old World. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **123**: 1237-1249, 1993.

POZIO, E.; MAROLI, M.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Laboratory transmission of ***Leishmania infantum*** to ***Rattus rattus*** by the bite of experimentally infected ***Phlebotomus perniciosus***. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 524-526, 1985.

RANGEL, E. F.; DE SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F. Infecção natural de ***Lutzomyia intermedia*** Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **79**: 395-396, 1984.

RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A. de ; WERMELINGER, E.D. ; BARBOSA, A.F. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de ***Lutzomyia intermedia*** Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Plebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **80**: 219-26, 1985.

RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; AZEVEDO, A.C.R.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 347-349, 1986.

- RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F. ; ANDRADE, C.A. Biologia de ***Lutzomyia intermedia*** Lutz & Neiva, 1912 (Diptera:Psychodidae), em condições experimentais. i. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**:431-438, 1986a.
- RANGEL, E.F.; AZEVEDO, A.C.R.; ANDRADE, C.A.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**: 39-45, 1990.
- RANGEL, E.F.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A.; SOUSA, N.A.; WERMELINGER, E.D. Development of ***Leishmania (Viannia) braziliensis*** Vianna, 1911 in ***Lutzomyia intermedia*** (Lutz & Neiva,1912) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) under experimental conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87**: 235-238, 1992.
- RANGEL, E.F.; TRAVI, B.L.; BARBOSA,A.F.; MONTOYA, J. Development of colombian isolates of ***Leishmania (Viannia) panamensis***, ***Le. (V.) guyanensis*** and ***Le.(V.)braziliensis*** in the sandfly ***Lutzomyia intermedia*** (Lutz & Neiva, 1912) under experimental conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **88**: 513-515, 1993.
- RANGEL, E.F.; MENESES, C.; AZEVEDO, A.; FRANCO, A.; MOREIRA, C.; MAYRINK, A.; GRIMALDI Fº, G. Leishmaniose cutânea no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: Ciclo silvestre e a ligação com o peri-domicílio. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **31**(supl.1): 132, 1998.
- REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. 731 p.

- ROCHA E SILVA, E.O.; CAPINZAIKI, A.N.; KURATOMI, C.A.; GUEDES, A.C. A leishmaniose tegumentar americana no litoral sul de Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, **32**: 9-25, 1980.
- ROJAS, E.; SCORZA, J.V.; ESPINOZA, A. Excreción de promastigotos de *Leishmania pifanoi* por *Lutzomyia youngi* experimentalmente infectada. *Rev. Saúde Pública*, **29**: 496-502, 1995.
- ROWTON, E.D. & LAWYER, P.G. Advances in sand fly colonization : A summary of workshop discussions at isops 1, Rome, 1991. *Parassitologia*, **33** (suppl.1): 33-37, 1991.
- RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State with particular reference to the rôle of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**: 353-359, 1987.
- RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; WALLBANKS, K.R. The transmission of suprapylarian *Leishmania* by the bite of experimentally infected sand flies (Diptera:Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**:425-430, 1987a.
- SALOMON, O.D.; TRAVI, B.L.; SEGURA, E.L. Note on sandflies associated with a tegumentary leishmaniasis focus in Salta, Argentina, 1988. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **37**: 91-92, 1995.

- SCHLEIN, Y.; BORUT, S.; JACOBSON, R.L. Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.*, **4**: 69-78, 1978.
- SCHLEIN, Y.; POLACHECK, I.; YUVAL, B. Mycoses , bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*, **90** :57-66, 1985.
- SCHLEIN, Y. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today*, **2**:175-177, 1986.
- SCORZA, J.V.; GOMEZ, I.; RAMIREZ, M. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 3. Notas bionómicas sobre *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1959 y *P. vexillarius* Fairchild e Hertig, 1952. *Acta Biol. Venez.*, **6**:28-40, 1968.
- SHANNON, R.C. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. *Am. J. Trop. Med.* , **19**:131-38, 1939 .
- SHORTT, H.E. Recent research on Kala-azar in India . *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **39**:13-41, 1945.
- SILVA, A.L.F.F.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N.; MAYRINK, W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**: 453-458, 1990.

- SMITH, R.O.A.; HALDER, K.C.; AHMED, I. Further investigations on the transmission of Kala-azar part IV. A second series of transmission of *L. donovani* by *P. argentipes*. *Ind. J. Med. Res.*, **29**:789-802, 1941.
- STOLF, H.O.; MARQUES, S.A.; MARQUES, M.E.A.; YOSHIDA, E.L.A.; DILLON, N.L. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Itaporanga, São Paulo (Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **35**: 437-442, 1993.
- STRANGWAYS-DIXON, J. & LAINSON, R. Dermal leishmaniasis in British Honduras: transmission of the *L. braziliensis* by *Phlebotomus* species. *Brit. Med. J.*, **3**:297-299, 1962.
- TANIGUCHI, H.H.; TOLEZANO, J.E.; CORRÊA, F.M.A.; MORAES, R.H.P.; VEIGA, R.M.O.; MARASSÁ, A.M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I-Composição da fauna flebotomínica no município de São Roque, Região de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **51**: 23-30, 1991.
- TOLEZANO, J.E.; MACORIS, S.A.G.; DINIZ, J.M.P. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **40**: 49-54, 1980.
- TOLEZANO, J.E.; ARAÚJO, M.F.L.; VALENTIM, A.M.; BALANCO, J.M.F. Isolamento de *Leishmania sp.* a partir de creme leucocitário de paciente com leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **48**: 1-3, 1988.

- TOLEZANO, J.E.; ARAUJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; VALENTIN, A.M.; BARCA, M.L. *Leishmania sp* isolated from blood heart of *Akodon sp* (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape city, São Paulo state, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **83** (supl. I): 38, 1988a.
- TOLEZANO, J.E.; ARAUJO, M.F.L.; REINA, R.B.; TANIGUCHI, H.H.; PIAZZA, R.; PINHEIRO, M.E.P.; WANDERLEY, D.M.V.; MOMEN, H.; CUPOLILLO, E.; CORRÊA, F.M.A. Leishmaniose tegumentar no município de São Roque, Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **33** (supl.8), 1991.
- TOLEZANO, J.E.; REINA, R.B.; GORLA, M.C.O.; MONTEIRO, A.V.; VALENTIN, A.M.; SILVA, M.V.; BATISTA, L.; MOMEN, H.; CUPOLILLO, E.; ARAÚJO, M.F.L. Diversidade de amostras de flagelados do Gênero *Leishmania* isolados no Estado de São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **86** (supl. I): 143, 1991a.
- TOLEZANO, J.E. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **89**: 427-434, 1994.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C.O.C. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 125-126, 1986.
- WALTERS, L.L.; IRONS, K.P.; CHAPLIN, G.; TESH, R.B. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **30**: 699-718, 1993.

- WALTERS, L.L. ***Leishmania*** differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Euk. Microbiol.*, **40**: 196-206, 1993.
- WALTONS, B.C.; SHAW, J.J.; LAINSON, R. Observations on the in vitro cultivation of ***Leishmania braziliensis***. *J. Parasitol.*, **63**: 1118-1118, 1977.
- WARBURG, A. & SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of ***Phlebotomus papatasi*** on the transmission of ***Leishmania major***. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**: 926-930, 1986.
- WARD, R.D. The colonization of ***Lutzomyia flaviscutellata*** (Diptera:Psychodidae) , a vector of ***Leishmania mexicana amazonensis*** in Brazil. *J. Med Entomol.*, **14**: 469-476, 1977.
- WARD, R.D.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera:Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* , **72**: 269-276, 1978.
- WERMELINGER, E.D.; RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; BARBOSA, A.F. A practical method for mass breeding of sandflies in the laboratory: ***Lutzomyia intermedia*** (Lutz & Neiva, 1912) and ***Lutzomyia longipalpis*** (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**:441-442, 1987.
- WILLIAMS, P. & COELHO, M.V. ***Leishmania*** in experimentally infected sandflies. *Adv. Parasitol.*, **16**: 1-42, 1978.

- WILSON, H.R.; DIECKMANN, B.S.; CHILDS, G. E. ***Leishmania braziliensis*** and ***Leishmania mexicana***: experimental cutaneous infection in golden hamsters. *Exp. Parasitol.*, **47**: 270-283, 1979.
- YARBUH, A.L. & SCORZA, J.V. Ensayos metodologicos para la investigacion de reservorios de ***Leishmania spp.*** en los Andes venezolanos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **77**: 367-384, 1982.
- YOSHIDA, E.L.A.; CORREA, F.M.A.; MARQUES, S.A.; STOLF, H.O.; DILLON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr.,G. Human, canine and equine (***Equus caballus***) leishmaniasis due to ***Leishmania braziliensis*** (= ***L.braziliensis braziliensis***) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**: 133-134, 1990.
- YOSHIDA, E.L.A.; CUBA,C.A.C.; PACHECO,R.S.; CUPOLILLO,E.; TAVARES,C.C.; MACHADO,G.M.C.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr.,G. Description of ***Leishmania (Leishmania) forattinii*** Sp. N., a new parasite infecting opossums and rodents in Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , **88**: 397-406, 1993.
- YOUNG, C.J.; TURNER, D.P.; KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J.A.; LEANEY, A.J. Fructose in wild-caught ***Phlebotomus ariasi*** and the possible relevance of sugars taken by sandflies to the transmission of leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**: 363-366, 1980.
- YOUNG, D.G.; PERKINS, P.V.; ENDRIS, R.G. A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **18**: 446, 1981.

YOUNG, D.G. & LAWYER. New world vectors of the leishmaniasis. In Harris, K.F. Ed. , *Current topics in vector research*, New York, Springer-Verlag, 1987. V.4, pp. 29-69.

YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of ***Lutzomyia*** and sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Amer. Entomol. Inst.*, **54**: 1-881, 1994.

ZELEDON, R.; POCE, C.; SOTO, R.A.; MURILLO, J. A. A method for the isolation of ***Leishmania braziliensis*** from sandflies. *5th Intl. Congr. Protozool. Abstr. of papers*, New York, 1977, p. 196.