Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Estudo da capacidade vetora de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna

Morgana M. Cavalcanti de S. L. Diniz

Dissertação apresentado ao programa de Pós – graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati

São Paulo
2013

Estudo da capacidade vetora de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna

Morgana M. Cavalcanti de S. L. Diniz

Dissertação apresentado ao programa de Pós – graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati

São Paulo

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita bondade e por guiar meus passos e pensamentos nas horas de incertezas.

À minha família que me deu o alicerce principal no conhecimento da vida.

À minha orientadora Dr. Eunice Galati pelo apoio, compreensão e esclarecimentos. Pessoa sem a qual esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Dr. Delsio Natal pela colaboração e colocações pertinentes.

Ao Dr. Claudio Casanova, da Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo – SUCEN, pela colaboração e esclarecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por concessão de bolsa de estudo.

Ao meu marido Marcio Diniz e minha filha Lara C. Diniz pela paciência, compreensão, apoio ...

Aos colegas de laboratório pela amizade construída ao longo desses anos de convívio.

Ao Mestre Fredy Galvis por dividir comigo os momentos de angústia e seus conhecimentos, fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

À Priscila Sábio pelas conversas, apoio, amizade verdadeira, colaboração.

À Cecília Lavitska pela amizade, apoio e sua constante colaboração, sem a qual teria sido muito difícil realizar esse trabalho.

Ao Dr. Andrey Andrade pelo conhecimento compartilhado, pela amizade, por está sempre disposto a ajudar e ouvir.

Ao Mestre Everton Falcão pela disponibilidade em ajudar, dividir seus conhecimentos, pela amizade sincera.

Aos proprietários das residências onde as coletas foram realizadas.

DINIZ LEAL, M.M.C. Estudo da capacidade vetora de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2013.

Resumo

Introdução - A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antroponose com o envolvimento de várias espécies de *Leishmania*, mamíferos reservatórios e flebotomíneos (vetores). Apresenta ampla distribuição no Brasil, com registro de casos em todas as unidades da Federação. É de interesse em saúde pública devido à gravidade de algumas de suas formas e alta prevalência em algumas regiões. Em áreas de transmissão na Grande São Paulo, têm sido registradas várias espécies de flebotomíneos, merecendo destaque *Pintomyia fischeri*, por ser altamente antropofílica e apresentar ampla distribuição no estado de São Paulo. **Objetivo** - Identificar a capacidade vetora dos flebotomíneos *Pintomyia fischeri* para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, um dos agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA), comparando-a com a de *Nyssomyia intermedia*, vetor desse parasita na região Sudeste do Brasil. **Métodos** - Os seguintes parâmetros foram identificados: em campo - densidade das espécies em relação a um hospedeiro (hamster), com a instalação da armadilha de Disney em duas áreas (município do Embu na Grande São Paulo e município de Iporanga, na região do Vale do Ribeira) e teste de uma nova armadilha (apenas em Iporanga); em laboratório, a partir de infecção experimental de flebotomíneos por meio da alimentação em hamsters infectados pelo parasita - probabilidade diária de sobrevivência dos flebotomíneos, duração do ciclo gonotrófico, período de incubação extrínseca dos parasitas, proporção de flebotomíneos que se alimentam em fonte infectante e que se tornaram infectivos. Com estes dados calculou-se a capacidade vetora (novas infecções que a população vetora levará adiante ao se alimentar em um hospedeiro infectado), pela expressão $V = m.a.b.E_{inf}$, onde V = capacidade vetora, m = proporção de fêmeas atraídas ao hospedeiro, a = proporção de fêmeas alimentando-se no hospedeiro/duração do ciclo gonotrófico, b = proporção de fêmeas infectadas que desenvolvem a forma infectante e E_{inf} = expectativa de vida infectiva.

Resultados – Em se tratando do parâmetro observado em campo (m), densidade de flebotomíneos/hamster/dia, na armadilha de Disney em Iporanga esse valor para *Ny. intermedia* foi de 0,027 e para *Pi. fischeri* (0,011), em Embu, para *Pi. fischeri* (0,103) e para nova armadilha, apenas em Iporanga, *Ny. intermedia* (7,9) e *Pi. fischeri* (0,11). Nos parâmetros obtidos em laboratório: sobrevida infectiva (E_{inf}): *Ny. intermedia* (0,84 dias) e *Pi. fischeri* (0,89 dias); proporção de fêmeas alimentadas em hamster: *Ny. intermedia* (0,77) e *Pi. fischeri* (0,67) e mediana do ciclo gonotrófico, para as duas espécies de 5 dias; período de incubação extrínseca para as duas espécies de 5 dias; e proporção de fêmeas infectadas por promastigotas que chegaram à forma infectante (b) para *Ny. intermedia* (0,90) e *Pi. fischeri* (0,311). A capacidade vetora obtida com a armadilha de Disney para *Ny. intermedia* em Iporanga foi de **0,0027** e para *Pi. fischeri* (**0,00089**) e no Embu para *Pi. fischeri* de 0,0083 e para a armadilha nova, em Iporanga apenas, *Ny. intermedia* (**0,8**) e *Pi. fischeri* (**0,0089**).

Conclusão - A capacidade vetora avaliada pelas armadilhas nova e a de Disney apresentou disparidades. Para *Ny. intermedia*, em Iporanga o valor da primeira foi 296,3 vezes maior que o da Disney e para *Pintomyia fischeri* foi 10 vezes maior. Na comparação entre o mesmo tipo de armadilha, em Iporanga para *Ny. intermedia* o valor da capacidade vetora obtido com a Disney foi 3,03 vezes superior ao de *Pi. fischeri* e na nova, foi 89,9 vezes. Para *Pintomyia fischeri*, os valores obtidos para a capacidade vetora considerando a Disney (Embu) foram 9,3 vezes maiores que os de Iporanga. A capacidade vetorial de *Pi. fischeri* (Embu) foi 3,07 vezes maior do que o de *Ny. intermedia* (Iporanga). Possivelmente as duas espécies atuem na transmissão da LTA no estado de São Paulo. Em Iporanga *Ny. intermedia* atua de maneira bem mais incisiva do que a *Pi. fischeri*. Por outro lado, no Embu, onde *Ny. intermedia* não tem sido capturada, a população de *Pi. fischeri* apresentou capacidade vetora superior à de *Ny. intermedia* (Iporanga), quando avaliadas segundo o mesmo tipo de armadilha para obtenção da densidade vetora.

Palavras – chave: Capacidade vetorial, flebotomíneos, Leishmaniose Tegumentar Americana.

DINIZ LEAL, M.M.C. Study vectorial capacity of *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) to *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo BR: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2013.

Abstract

Introduction– American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an anthroponosis involving several species of *Leishmania*, mammalian reservoirs and phlebotomine vectors. It is widespread in Brazil, cases having been registered in all the states. It constitutes a serious public health problem due to the gravity of some of its forms and its high prevalence in some regions. Several species, including *Pintomyia fischeri* that is dominant, widespread and anthropophilic, have been registered in areas of transmission within the metropolitan region of Greater São Paulo, **Objective** – To identify the vectorial capacity of *Pintomyia fischeri* for *Leishmania (Viannia) braziliensis*, one of the agents of ACL, comparing it with that of *Nyssomyia intermedia*, a vector of this parasite in Southeastern Brazil. **Methods** – The following parameters were identified: in the field – density of the species in relation to a host (hamster), with the installation of a Disney trap in two areas: Embu municipality (within Greater São Paulo) and Iporanga municipality (in the Ribeira Valley region), and a new trap (in Iporanga); in the laboratory – on the basis of the experimental infection of sandflies which fed on hamsters infected with the parasite; daily probability of survival of the sandflies; duration of the gonotrophic cycle; extrinsic period of incubation of the parasite; proportion of phlebotomines which fed on the infective host and which themselves became infectious. With these data the vectorial capacity (new infections which the vector population will transmit when it feeds on an infected host) was calculated, using the expression $V = m.a.b.E_{inf}$, where V = vectorial capacity, m = proportion of females attracted to the host, a = proportion of females feeding on the host/duration of gonotrophic cycle, b = proportion of infected females which develop the infective forms of the parasite and E_{inf} = infective life expectancy. **Results** – As regards the parameter observed in the field (m), density of insects/hamster/day, in the Disney trap in Iporanga this value for *Ny. intermedia* was 0.027 and for *Pi. fischeri*, 0.011, in

Embu, for *Pi. fischeri* , 0.103 and for the new trap in Iporanga, for *Ny. intermedia*, 7.9 and for *Pi. fischeri*, 0.11. In the laboratory: infective life expectancy (E_{inf}): *Ny. intermedia* (0.84 days) and *Pi. fischeri* (0.89 days); proportion of females fed on the hamster: *Ny. intermedia* (0.67) and *Pi. fischeri* (0.77) and median of the duration of the gonotrophic cycle for both species, of 5 days; and proportion of females infected by promastigotes which attained infective form (b) for *Ny. intermedia* (0.90) and *Pi. fischeri* (0.59). The vectorial capacity obtained with the Disney trap for *Ny. intermedia* in Iporanga was 0.0027 and for *Pi. fischeri*, 0.00089 and in Embu for *Pi. fischeri*, 0.0083 and for the new trap only in Iporanga, *Ny. intermedia* (0.8) and *Pi. fischeri* (0.0089).

Conclusion – The vectorial capacity measured by the new and the Disney traps presented considerable differences. For *Ny. intermedia* in Iporanga the value of the former was 296.3 times greater than that of the Disney and for *Pintomyia fischeri* it was 10 times greater. In the comparison between traps of the same kind, in Iporanga for *Ny. intermedia* the value of vectorial capacity obtained with the Disney trap was 3.03 times greater than that of *Pi. fischeri* and in the new trap it was 89.9 times greater. For *Pintomyia fischeri*, the vectorial capacity obtained with Disney (Embu) was 9.3 times greater than that for Iporanga. The vectorial capacity of *Pi. fischeri* (Embu) was 3.07 times greater than that of *Ny. intermedia* (Iporanga). Possibly both species are active in the transmission of ACL in the state of São Paulo. In Iporanga *Ny. intermedia* acts in a much more incisive way than *Pi. fischeri*. On the other hand, in Embu, where *Ny. intermedia* was not captured, the *Pi. fischeri* population presented a vectorial capacity greater than that of *Ny. intermedia* (Iporanga) when assessed by the same type of trap for the calculation of vector density.

Key-words: Vectorial capacity, phlebotomines, American cutaneous leishmaniasis.

ÍNDICE

1.Introdução.....	12
1.1.Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – Aspectos clínicos e epidemiológicos.....	12
1.2. <i>Leishmania spp</i> ; <i>Leishmania(Viannia) braziliensis</i> e seus vetores	13
1.3.Os vetores.....	14
1.4.Biologia de flebotomíneos.....	15
1.5.Interação parasita – vetor – hospedeiro.....	16
1.6.A Capacidade Vetora.....	18
2. Justificativa.....	20
3.Objetivo.....	22
3.1.Objetivos específicos.....	22
4.Material e Métodos.....	23
4.1.Densidade de flebotomíneos em relação aos hospedeiros sob investigação	23
4.1.1.Nova Armadilha	25
4.2.Obtenção da geração F1	26
4.3.Alimentação das fêmeas de campo em laboratório.....	27
4.4.Individualização das fêmeas ingurgitadas.....	27
4.5.Transferência dos ovos e seguimento das formas imaturas.....	28
4.6.Obtenção dos parâmetros de sobrevivência, período de ciclo gonotrófico, taxa do 1 ^o repasto sanguíneo e os subsequentes.....	28
4.6.1.Sobrevivência.....	28
4.6.2.Período do ciclo gonotrófico.....	29
4.6.3.Taxa do primeiro repasto sanguíneo.....	29
5.Investigação da taxa de infecção experimental por <i>L. braziliensis</i> e período de incubação extrínseca.....	30
6.Forma de análise dos dados.....	30
7.Aspectos da Ética animal.....	32
8.Biossegurança.....	32
9.Resultados.....	33
9.1.Densidade de flebotomíneos em relação ao hamster.....	33
9.1.1.Nova armadilha.....	34
9.2.Observação das espécies estudadas.....	35
9.2.1. <i>Nyssomyia intermedia</i>	35
9.2.2. <i>Pintomyia fischeri</i>	37
9.3.Comparação das espécies envolvidas no estudo.....	39
9.3.1.Proporção de fêmeas que se alimentaram no hamster (AI).....	39
9.3.2.Duração do ciclo gonotrófico.....	39
9.3.3.Hábito de picar o hamster.....	40
9.3.4.Período de incubação extrínseca.....	40
9.3.5.Proporção de fêmeas com formas infectantes entre as fêmeas infectadas (b).....	41
9.3.6.Expectativa de infectiva (Ex _{inf})	42
9.3.7.Capacidade Vetorial.....	42
9.3.7.1. <i>Nyssomyia intermedia</i> (Armadilha Disney- Iporanga).....	43
9.3.7.2. <i>Nyssomyia intermedia</i> (Nova armadilha – Iporanga).....	

9.3.7.3. <i>Pintomyia fischeri</i> (Armadilha Disney – Iporanga).....	44
9.3.7.4. <i>Pintomyia fischeri</i> (Nova armadilha – Iporanga).....	44
9.3.7.5. <i>Pintomyia fischeri</i> (Disney - Embu).....	45
9.3.8. Comparação da Capacidade Vetorial das espécies envolvidas no estudo	45
10.Discussão.....	46
10.1.Densidade das espécies de flebotomíneos envolvidas no estudo em relação ao hamster.....	46
10.2. Hábito de Picar o hospedeiro (a).....	47
10.3. Taxas de infecção experimental e proporção de fêmeas infectadas que realmente são infectantes (b).....	48
10.4. Período de Incubação extrínseca (n).....	50
10.5. Expectativa de vida infectiva do vetor.....	50
10.6. Comparação da capacidade vetorial de <i>Ny. intermedia</i> e <i>Pi. Fischeri</i>	52
11.Conclusões.....	54
12.Referências.....	55
Anexos.....	63
Anexo - 1.Autorização para atividades científicas – SISBIO.....	63
Anexo - 2.Declaração de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.....	64
Anexo - 3. Declaração de aprovação do projeto pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP.....	65
Anexo - 4.Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Biossegurança da FSP/USP.....	66
Currículo Lattes – Morgana M. C. de S. L. Diniz.....	67
Currículo Lattes – Prof. ^a Dr. ^a Eunice Aparecida Bianchi Galati.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de flebotomíneos, segundo espécie, sexo, local e dias de coletas, capturados em armadilhas de Disney contendo um hamster e valor de m (nº de fêmeas/hamster/noite).....	34
Tabela 2. Número de flebotomíneos de <i>Ny. intermedia</i> capturados com a armadilha CDC modificada segundo sexo e presença de isca, no município de Iporanga, 26 de maio a 01 de junho de 2012.....	34
Tabela 3. Sobrevida das fêmeas de <i>Ny. intermedia</i> ingurgitadas em hamster infectado pela <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	35
Tabela 4. Tábua de vida de fêmeas de <i>Ny. intermedia</i> , após repasto sanguíneo em hamster infectado por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	36
Tabela 5. Sobrevida das fêmeas de <i>Pi. fischeri</i> ingurgitadas em hamster infectado pela <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	37
Tabela 6. Tábua de vida de fêmeas de <i>Pi. fischeri</i> , após repasto sanguíneo em hamster infectado por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	38
Tabela 7. Número de machos e fêmeas expostos a hamster infectado pela <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	39
Tabela 8. Duração do Ciclo Gonotrófico em condições de laboratório <i>Ny. intermedia</i> e de <i>Pi. fischeri</i>	39
Tabela 9. Estimativa do parâmetro “a” para as espécies sob investigação	40
Tabela 10. Infecção experimental de flebotomíneos provenientes de Iporanga e Embu em hamster infectado por <i>L. braziliensis</i> , segundo espécie, e horas pós-repasto sanguíneo	41
Tabela 11. Proporção de fêmeas de <i>Ny. intermedia</i> e <i>Pi. fischeri</i> com infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	41
Tabela 12. Expectativa de vida para as coortes das espécies de flebotomíneos seguidas a partir do repasto sanguíneo em hamster infectado por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	42
Tabela 13. Resumo dos parâmetros usados na estimativa da capacidade vetorial das espécies envolvidas no estudo	42

Lista de figuras

Figura 1. Armadilha de Disney, Iporanga	24
Figura 2. Armadilha de Disney, Embu	24
Figura 3. Armadilha nova para atratividade de hamster a flebotomíneo.....	25
Figura 4. Tubo de acrílico para obtenção de desova das fêmeas grávidas.....	27
Figura 5. Fêmeas de flebotomíneos alimentando-se em hamster infectivo.....	29

1. Introdução

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) - Aspectos clínicos e epidemiológicos

A leishmaniose, zoonose que desperta atenção na saúde pública, representa um complexo de doenças causadas por várias espécies do gênero *Leishmania* e manifesta-se clinicamente nas formas: visceral, tegumentar e mucocutânea. Existem, pelo menos, 350 milhões de pessoas vivendo em área de risco de transmissão, distribuídas em 88 países, com prevalência de 12 milhões de casos e incidência anual de 2 milhões de casos (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2007). Na América, o Brasil é o único país que se encontra entre os sete onde se registram 90% dos casos da leishmaniose visceral no mundo (WHO 2012).

A leishmaniose normalmente é uma doença zoonótica com uma grande variedade de reservatórios podendo envolver animais selvagens ou domésticos como reservatórios, mas pode ocorrer de forma antrópica em epidemias e ambientes urbanos (BAILEY et al., 2007; KAMHAWI, 2006).

A grande importância que a leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa para a saúde pública brasileira se deve ao fato de sua vasta distribuição geográfica e do seu alto grau de destruição observada em manifestações cutâneas e mucocutâneas (TOLEZANO, 1994).

A LTA é uma doença infecciosa não contagiosa. A forma da doença causada pela *Leishmania (V.) brasiliensis* é caracterizada por lesões cutâneas e mucosas. De maneira geral, a manifestação cutânea provoca pápulas que evoluem para úlceras com fundo granuloso e bordas infiltradas; a forma mucosa é caracterizada pela ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe, podendo ocorrer perfuração do septo nasal ou palato (BRASIL, 2006, 2007).

No Brasil considerada uma doença complexa e suas características clínicas e epidemiológicas podem variar de acordo com as espécies de flebotomíneos envolvidos, a susceptibilidade e o nível de exposição da população humana como também a diversidade e competência dos reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão (BRITO et al., 2012).

Na década de oitenta, aconteceu uma expansão geográfica da LTA no Brasil, quando houve registro de casos em 19 estados; já no ano de 2003, a autoctonia foi reportada em todos os estados. Têm-se evidências de que a LTA esteja presente no interior do estado de São Paulo desde 1884 (PESSOA e BARRETO, 1948; TOLEZANO, 1994; BRASIL, 2006) e a sua expansão acompanhou a devastação das matas para o cultivo de café no século dezenove e primeiras décadas do século vinte, tornando-se endêmica no sul do Estado na década de setenta (TOLEZANO, 1994).

1.2. *Leishmania spp; Leishmania (Viannia) braziliensis* e seus vetores

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocitário em animais de sangue quente, no qual se localizam e se dividem; seu ciclo de vida é dividido entre hospedeiro invertebrado e vertebrado e nestes causam um grupo de doenças que afetam os humanos e vários outros animais (BATES, 2007; SOARES et al., 2011; BRASIL, 2007; PIMENTA et al., 2012).

Lainson e Shaw, em 1987, classificaram as espécies do gênero *Leishmania* em três categorias, segundo o desenvolvimento do tubo digestório dos vetores: suprapilária, peripilária e hipopilária.

Várias espécies de *Leishmania* que provoca doenças nas formas visceral e tegumentar em humanos apresenta comportamento suprapilário. O seu desenvolvimento no inseto ocorre apenas na porção do trato digestivo anterior ao piloro, principalmente nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio; parasitos com esse comportamento pertencem ao subgênero *Leishmania* e ocorrem nas Américas e no Velho Mundo.

As leishmânias com comportamento hipopilórico desenvolvem-se apenas no intestino posterior do vetor, ou seja, a parte posterior ao piloro. São parasitas de lacertídeos, encontradas apenas no Velho Mundo e classificadas no subgênero *Sauroleishmania* (LAINSON e SHAW 1987; SCHÖNIAN et al., 2010).

Os parasitos com comportamento peripilórico iniciam a infecção na parte posterior do intestino (médio abdominal) depois, deslocam-se para a região do intestino posterior (pós - piloro) e para as porções mais anteriores do tubo digestório durante o seu desenvolvimento. Esses parasitos encontram-se distribuídos no

subgênero *Viannia* e são restritos ao Novo Mundo (PIMENTA et al., 2012; LAISON, 2010).

Nas Américas, são reconhecidas onze espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar em humanos. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo uma do subgênero *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis*, com ampla distribuição no território brasileiro e seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, encontrada em todas as regiões, e *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, restritas à região amazônica.

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é um dos principais responsáveis pelos casos de LTA no Brasil por possuir plasticidade, ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todo território nacional e apresentar várias espécies de flebotomíneo implicadas na sua transmissão (BRASIL, 2007; RYAN et al., 1987). Foi em 1909 que pesquisadores observaram a presença de parasitas amastigotas nas lesões da pele de indivíduos com “úlceras de Bauru” no Estado de São Paulo (LAINSON, 2010).

Apesar de ser amplamente distribuída e apresentar várias espécies de flebotomíneos envolvidos na sua transmissão, existe apenas um único vetor comprovado no Pará, que é *Psychodopygus wellcomei* (RYAN et al., 1987). Todavia, com base na antropofilia, elevadas frequências e encontro de infecção natural por flagelados ou estes sendo identificado como *Leishmania (Viannia) sp.*, em área onde os casos humanos têm sido atribuídos a este parasita (distribuição geográfica coincidente), são apontadas outras espécies (Quadro 1).

1.3. Os vetores

São vários os parâmetros da relação inseto-hospedeiro vertebrado-parasita utilizados para apontar uma espécie de flebotomíneo como vetora de um agente: hábito alimentar do inseto, distribuição geográfica coincidente com a da infecção pelo parasita, densidade elevada para manter a infecção na natureza, sobrevivência suficiente para garantir o período de incubação extrínseca (período entre a infecção do inseto e a transformação em formas infectantes) do parasita e a competência vetora (capacidade do inseto de se infectar e transmitir o parasita isolado dos casos humanos) demonstrada (KILLICK-KENDRICK, 1990). São poucas as espécies que tiveram esses atributos demonstrados. Frequentemente, são implicadas como

vetoras tendo como base a distribuição geográfica coincidente com a do parasita, frequências elevadas e antropofilia; para poucas espécies tem-se também a identificação da infecção natural pelo parasita; e para raras espécies, a capacidade vetora comprovada (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Dentre os cerca de 500 táxons (espécies ou subespécies) de flebotomíneos descritas para a América (GALATI, 2003), aproximadamente 10% delas têm sido implicadas na transmissão de *Leishmania* spp. (CIPA GROUP, 1999). Isto decorre das dificuldades de se cultivar em laboratório as espécies de flebotomíneos, obter as infecções experimentais e demonstrar a competência em relação aos parasitas. Segundo a Classificação de GALATI (2003), que divide os flebotomíneos americanos em 23 gêneros, os vetores de agentes das leishmanioses estão distribuídos, principalmente, em sete deles: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*.

1.4. Biologia de flebotomíneos

Os imaturos de flebotomíneos desenvolvem-se em solo úmido, rico em matéria orgânica e protegidos da incidência direta da luz solar (FORATTINI, 1973). A duração do ciclo de vida varia em função da temperatura. ENDRIS et al. em 1984 observaram para *Dampfomyia anthophora*, a 20°C um período médio de 83,3 dias e desvio padrão = 9,3 dias; a 24°C (49,5; 2,0 dias); a 28°C (39,1; 2,9 dias) e a 32°C (33,5; 3,7 dias). Para *Ny. intermedia*, em temperaturas variando entre 25-26 °C, verificou-se uma média de 34,9 dias e para *Ny. neivai*, 45,1 dias (ANDRADE-FILHO et al., 2004) e para *Lu. longipalpis*, a 25 °C, com quatro tipos distintos de alimentação das fêmeas, 32,5 dias (RANGEL et al., 1985). Os abrigos dos adultos, geralmente são representados por locais protegidos do vento e do sol, com alta umidade. Machos e fêmeas deslocam-se em voos curtos e também caminham sobre superfícies e dispersam sem se afastarem muito de seus abrigos. Estudos de captura-marcação-soltura-recaptura revelaram que em sua maioria os flebotomíneos são recapturados a menos de 250m do ponto de soltura (MORRISON et al., 1993; CASANOVA et al., 2005; GALATI et al., 2009).

As fêmeas praticam hematofagia em vários tipos de hospedeiros: animais de sangue frio, aves e mamíferos. O primeiro repasto sanguíneo frequentemente ocorre a partir do 2º ou 3º dias pós-eclosão. As fêmeas que sobrevivem à oviposição,

comumente procuram um novo repasto após este evento; no entanto, algumas fêmeas grávidas podem se realimentar antes da postura. O tempo que decorre entre a ingestão sanguínea e a oviposição pode variar de 3 a 13 dias (BARRETTO, 1942). CASANOVA et al. (2009) observaram, em campo, para *Ny. neivai*, um período de ciclo gonotrófico de 4,0 dias.

A expectativa média de vida ao nascer (e_0) e probabilidade de sobrevivência média diária (S) para duas espécies (*Ny. intermedia s. lat.* e *Ny. whitmani*) variaram segundo a condição e qualidade de alimentação das fêmeas: quando não alimentadas, esses valores foram, respectivamente, de (e_0) = 4,91 dias e S = 0,61, alimentadas apenas com solução de açúcar (e_0 = 9,58 e S = 0,78); apenas com sangue (e_0 = 13,54 e S = 0,81), alimentadas alternativamente com sangue e açúcar (e_0 = 17,45 dias e S = 0,84); assim como para a condição fecundação das fêmeas: fecundadas (e_0 13,11 dias e S = 0,81) e não fecundadas (e_0 = 16,34 e S = 0,83) (BARRETTO, 1942). Em campo, CASANOVA et al. (2009), utilizando o método de captura-marcação-soltura-recaptura, encontraram para *Ny. neivai*, expectativa média de vida de 2,54 dias e probabilidade de sobrevivência diária de 0,675.

1.5. Interação Parasita – vetor - hospedeiro

O processo de interação vetor-parasito inicia-se quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado por parasitas, esses parasitas possuem um complexo ciclo de vida que envolve diversas formas de desenvolvimento (PIMENTA et al., 2012)

Quadro 1. Autores que descreveram infecção natural ou experimental em flebotomíneos por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, ou por *Leishmania (Viannia)* sp. ou por flagelados em área com casos humanos de leishmaniose tegumentar, cuja etiologia se atribui a *L. (V.) braziliensis* e respectivas regiões do Brasil.

Espécie de flebotomíneo	Infecção natural por <i>Le. (V.) braziliensis</i>	Infecção natural por <i>L. (V.) sp.</i>	Infecção natural por flagelados	Infecção experimental por <i>Leishmania sp.</i>	Regiões do Brasil
<i>Lutzomyia almerioi</i>		SAVANI et al. (2009)		<i>L. braziliensis</i> (SANTOS, 2007)	CO
<i>Lutzomyia longipalpis</i>		SAVANI et al. (2009)		<i>L. braziliensis</i> PAIVA et al. (2006)	CO SE
<i>Migonomyia migonei</i>	QUEIROZ et al. (1994) PITA-PEREIRA et al. (2005)		PESSOA e PESTANA, 1940 PESSOA e COUTINHO, 1941	<i>L. sp.</i> (PESSOA e COUTINHO, 1941)	NE SE
<i>Nyssomyia intermedia</i>	PITA-PEREIRA et al. (2005)			<i>L. sp.</i> (ARAGÃO, 1922) <i>L. braziliensis</i> RANGEL et al. (1992)	SE
<i>Nyssomyia neivai</i>	PITA-PEREIRA et al. (2009)	RANGEL et al. (1984) MARCONDES et al. (2009)	FORATTINI e SANTOS, 1952 FORATTINI et al. (1972) CASANOVA et al. (1995)		SE S
<i>Nyssomyia whitmani</i>	HOCH et al. (1986) QUEIROZ et al. (1994) LUZ et al. (2000)	AZEVEDO et al. (1990) SILVA e GRUNEVALD (1999) OLIVEIRA- PEREIRA et al. (2006) CARVALHO et al. (2008)	PESSOA e COUTINHO, 1941 GALATI et al. (1996)	<i>L. sp.</i> (PESSOA e COUTINHO, 1941)	N, NE, CO, SE S
<i>Pintomyia fischeri</i>			ROCHA et al. (2010)	<i>L. sp.</i> (PESSOA e COUTINHO, 1941)	SE
<i>Pintomyia misionensis</i>		SILVA e GRUNEVALD (1999)			S
<i>Pintomyia pessoai</i>		SILVA e GRUNEVALD (1999)	FORATTINI et al. (1972) PESSOA e COUTINHO, 1941		SE S
<i>Psychodopygus carrerai</i>	GRIMALDI et al. (1991)				N
<i>Psychodopygus complexus</i>	SOUZA et al. (1996)				N
<i>Psychodopygus davisi</i>	GRIMALDI et al. (1989)				N
<i>Psychodopygus squamiventris</i>	GRIMALDI et al. (1991)				N

A infecção do flebotomíneo por *Leishmania* ocorre quando a fêmea ao se alimentar em uma fonte infectante ingere macrófagos com as formas amastigotas. Estas, no tubo digestivo do flebotomíneo, quando adaptadas ao meio, sofrerão a metaciclogênese, passando por várias formas: procíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclicas, estas últimas são as infectantes para os mamíferos; porém para chegar até a forma infectante o parasita precisa vencer inúmeras barreiras dentro do vetor (ação de enzimas digestivas, matriz peritrófica, expulsão) (KAMHAWI, 2006; PIMENTA et al., 2012). A metaciclogênese ocorre num período entre 2 a 8 dias (RANGEL et al., 1992; KAMHAWI, 2006; CASANOVA et al., 2009). A transmissão das promastigotas dar-se-á quando o inseto infectado ao picar um hospedeiro regurgitará formas metacíclicas juntamente com o sangue regurgitado. O regurgitamento do sangue ocorre devido ao bloqueio do gel secretado pelas promastigotas formando um “plug” localizado posteriormente à válvula estomodeal, que impede a sua passagem através do canal alimentar (KAMHAWI, 2006).

A taxa de infecção natural de flebotomíneos por leishmânia varia em função do nível de circulação do parasita na biocenose e do método utilizado para detecção dos parasitas. Em focos de LTA, têm sido observadas, por dissecação, taxas próximas a 0,2% (BARRETTO, 1943; GALATI et al., 1996) e em focos de leishmaniose visceral americana, até 7% (LAINSON et al., 1985). Em testes moleculares essas taxas podem ser mais elevadas (PITA-PEREIRA et al., 2005; PAIVA et al., 2007).

1.6. A Capacidade Vetora

A capacidade vetora da população de um inseto hematófago é definida como a taxa diária de picadas potencialmente infectivas que a população de um vetor levará adiante ao se alimentar em um único tipo de hospedeiro (REISEN, 1989).

Como parâmetros para identificar a capacidade vetora de uma determinada espécie em relação a um agente, além da distribuição coincidente com a da infecção, são considerados a densidade da espécie, o hábito de picar um determinado hospedeiro, a duração do ciclo gonotrófico, a proporção de insetos infectados que realmente são infectantes, o período de incubação extrínseca e a expectativa de vida infectiva das fêmeas da população.

Baseados em estudos da malária, que se pressupunha o homem como único hospedeiro do parasita, equações que permitem estimar a capacidade vetora de uma determinada população foram desenvolvidas (MCDONALD, 1952) e posteriormente modificadas (GARRET-JONES e SHIDRAWI, 1969; REINSEN, 1989; GALVIS, 2011) como a apresentada a seguir:

$$V = (m) (a) (b) (e_{inf})$$

Onde:

V = indica o número de novas infecções que poderiam ser geradas por cada dia de exposição de um hospedeiro infectado a uma população de vetores.

m = densidade dos flebotomíneos em relação ao hamster, estimada como o número de fêmeas atraídas ao hamster por dia (dado de campo).

a = estimado como AI/GC, sendo AI a proporção de fêmeas que se alimentaram no hamster infectado pela *L. (V.) braziliensis* e GC a duração do ciclo gonotrófico.

b = proporção de fêmeas que se infectaram e que são realmente infectantes. Indica a proporção de fêmeas que apresentaram formas metacíclicas no total das fêmeas que adquiriram a infecção.

n = período de incubação extrínseca, sendo o tempo mediano desde a alimentação no hamster infectado até o surgimento das formas infectantes.

e_{inf} = expectativa de vida infectiva da população de fêmeas após se tornarem infectantes.

2. Justificativas

O sucesso na transmissão da leishmânia depende da sua adaptação ao tubo digestório dos vetores, de modo a se desenvolverem até atingir a forma infectante e com carga suficiente que garanta a infecção no hospedeiro vertebrado. Algumas espécies de *Leishmania* dependem de vetores específicos para o seu desenvolvimento até a forma infectante (KAMHAWI, 2006). Esses vetores são dotados de mecanismos fisiológicos que propiciam a resistência da leishmânia ao ataque das enzimas no início da digestão sanguínea e que permitem a fixação dos flagelados na parede do tubo digestório, para evitar que sejam expulsos juntamente com as fezes. Todavia, outras espécies de leishmânia não dependem de um vetor específico para o seu desenvolvimento até a forma infectante, sendo denominados de vetores permissíveis. Estudos com infecções experimentais (ROGERS e BATES, 2007; PAIVA et al., 2007; SANTOS, 2007) ou o encontro de flebotomíneos naturalmente infectados por leishmânia (CARVALHO et al., 2008; SAVANI et al., 2009) reforçam o conceito de vetores permissíveis, em contrapartida aos vetores específicos. VOLF e MYSKOVA (2007) e MYSKOVA et al. (2007) sugerem participação de outras moléculas, que não a lipofosfoglicana, que auxiliariam na fixação dos flagelos das promastigotas no tubo digestório dos flebotomíneos ou a ação de outros mecanismos atuando nesse processo.

O encontro de infecção natural em flebotomíneos não reconhecidos como vetores específicos suscita a necessidade de se investigar outras espécies que poderiam atuar na transmissão dos agentes das leishmanioses.

No caso particular das áreas de transmissão de LTA na Grande São Paulo, as espécies *Pintomyia fischeri*, *Pintomyia monticola*, *Migonemyia migonei* e *Evandromyia cortelezzii* têm sido capturadas (IVERSSON et al., 1979, 1982; SUCEN, 2005); destas, merecem destaque *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* por serem antropofílicas e estarem amplamente distribuídas no Estado de São Paulo (CAMARGO-NEVES et al., 2002).

Pintomyia fischeri foi apontada por BARRETTO (1943) como possível vetor de agente da LTA devido à sua capacidade de se infectar experimentalmente (PESSOA e COUTINHO, 1941), alta antropofilia e abundância no interior dos domicílios e de abrigos de animais domésticos, quando situados até 80 m das matas. Em área endêmica de *L. braziliensis* no estado do Espírito Santo, das fêmeas de

flebotomíneos capturadas, 76 eram de *Pi. fischeri* e 18 delas apresentaram infecção natural por flagelados; dentre estas, em uma delas foi detectada a presença de *L. braziliensis* (ROCHA et al., 2010)

A capacidade vetorial além da densidade envolve outros parâmetros. Assim, para *Pi. fischeri*, julga-se oportuna a avaliação em condições laboratoriais dos parâmetros relativos à sobrevivência, duração do ciclo gonotrófico, ao hábito de se alimentar em hospedeiros da *L. braziliensis*, à taxa de infecção e ao período de incubação extrínseca em relação a este parasita.

3. OBJETIVO

Como objetivo geral pretendeu-se identificar a capacidade vetora dos flebotomíneos *Pintomyia fischeri* para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, um dos agentes da LTA, comparando-a com a de *Nyssomyia intermedia*, vetor desse parasita na região Sudeste do Brasil.

3.1. Objetivos específicos

Em relação às duas espécies de flebotomíneo têm-se

- Estimar a taxa de sobrevivência diária e expectativa média de vida infectiva;
- Identificar o período do ciclo gonotrófico;
- Determinar a taxa de alimentação em hospedeiros do parasita num primeiro repasto sanguíneo e sucessivo.
- Estimar a taxa de infecção experimental pela *Leishmania (V.) braziliensis*;
- Estimar o período de incubação extrínseca para a *Leishmania (V.) braziliensis*;
- Estimar a capacidade vetora para *L. (V.) braziliensis*, e
- Comparar a capacidade vetora para *Leishmania (V.) braziliensis* entre elas

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Densidade dos flebotomíneos em relação aos hospedeiros sob investigação (m)

A obtenção deste parâmetro foi realizado por meio de capturas de *Pi. fischeri*, e *Ny. intermedia* com armadilhas de Disney. Neste tipo de armadilha, um hamster permaneceu exposto, protegido em uma gaiola com alimento e água *ad libitum*, e placas untadas com óleo de rícino onde os insetos poderiam pousar, foram colocadas cerca de 20 cm abaixo e acima da gaiola com hamster. Esse mesmo método de captura foi utilizado por DORVAL et al. (2007) a fim de conhecer a fauna de flebotomíneos em área endêmica leishmaniose tegumentar .

As armadilhas ficaram instaladas diariamente e revisadas a intervalos que variaram de uma semana a um mês, para detectar a presença de flebotomíneos. Os insetos capturados foram transferidos para um tubo de Falcon contendo xilol e transportados ao laboratório onde foram clarificados, montados e identificados. As gaiolas foram instaladas por um período de um ano.

As capturas de *Pi. fischeri* foram realizadas no município de Embu e de *Ny. intermedia*, no Bairro Serra, município de Iporanga, onde a densidade dessas espécie se mostrou elevada (SUCEN, 2005; GALATI et al., 2009). Foram instaladas duas armadilhas em cada localidade, uma na margem da mata e a outra no peridomicílio.

As capturas para as duas localidades nem sempre se deram de maneira satisfatória, aconteceram vários fatos que influenciaram na obtenção desse parâmetro. Algumas vezes as armadilhas passaram dias sem a presença dos hamsters, pois os proprietários de uma das localidades retiravam os mesmos das gaiolas quando o tempo estava chuvoso e não os recolocavam. Houve também predação de hamster ou morte natural de alguns animais.

Ao longo dos experimentos observou-se baixa densidade de flebotomíneos nas armadilhas de Disney. Com o intuito de investigar se esta baixa atratividade se dava pelo tipo de armadilha testou-se uma outra que será descrita mais adiante.

Figura 1. Armadilha de Disney instalada na margem da mata, em Iporanga.
Foto cedida por F. Galvis.

Figura 2. Armadilha de Disney instalada na margem da mata em Embu
Foto cedida por F. Galvis.

4.1.1. Nova armadilha testada (CDC modificada)

A armadilha consistiu-se de uma jarra plástica, telada em sua boca com malha que impede o contato dos insetos com o hamster. No corpo da jarra foi feito um furo para introduzir o bico da mamadeira com água para o hamster. No interior da jarra colocou-se maravalha, um pouco de ração e o hamster. Este dispositivo foi preso à tampa da armadilha automática, tipo CDC, sem luz, que permaneceu exposto das 18:00 às 6:00 horas. Próximo a esta armadilha foi instalada outra armadilha CDC, também sem luz, porém com a jarra sem o hamsters (controle).

O experimento foi desenvolvido no bairro Serra, em Iporanga, em peridomicílio, durante seis noites consecutivas no período de 26 de maio a 1º de junho de 2012. A cada noite foram instaladas três armadilhas com hamsters e duas sem hamsters (controles).

Figura 3. Armadilha nova para atratividade de hamster a flebotomíneos.

Foto cedida por F. Galvis

4.2. Obtenção da geração F1

Pi. fischeri. Os espécimes foram capturados no município de Embu e no Parque Estadual da Cantareira em São Paulo (região da Grande São Paulo), nos quais se teve informações prévias da ocorrência da espécie com densidade elevada (SUCEN, 2005; MOSCHIN, 2010). As coletas foram realizadas com armadilhas de Shannon modificadas nas cores branca e preta (GALATI et al., 2001) instaladas das 18:00 às 23:00 horas em áreas próximas à mata (Embu) ou no interior da mata (Parque Estadual da Cantareira). Os insetos foram capturados com aspirador de Castro e os espécimes transferidos para pequenas gaiolas em nylon, nas quais foram transportados para o laboratório. Estas gaiolas foram cobertas com toalhas úmidas para garantir a umidade aos insetos. No insetário, foram introduzidos animais (aves ou hamsters) para que as fêmeas se alimentassem.

Ny. intermedia as coletas foram realizadas com armadilhas de Shannon branca e preta e com armadilhas automáticas luminosas instaladas no peridomicílio.

A criação dos flebotomíneos em laboratório para a obtenção da geração F1 foi feita mediante o método empregado por KILLICK-KENDRICK e KILLICK-KENDRICK (1991) adaptada por GALVIS (2011).

4.3. Alimentação das fêmeas de campo em laboratório

O repasto sanguíneo das fêmeas de campo foi feito em hamster ou em codorna. O hamster foi anestesiado e colocado dentro da gaiola contendo os insetos. A anestesia foi realizada por injeção intramuscular de uma dose máxima de 0,25 ml de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina 2%, em uma diluição 1:10, respectivamente. Quando utilizado codorna, esta foi imobilizada por meio de uma tela e colocada no interior da gaiola; ambos os animais ficaram expostos por 50 minutos.

4.4. Individualização das fêmeas ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas foram agrupadas uma em gaiola e permaneceram na mesma até o período próximo à sua oviposição, quando foram individualizadas em tubos de acrílico (35,5mm altura x 26,7mm diâmetro). Neste havia uma camada de gesso no fundo, para a manutenção da umidade e um papel de filtro em seu interior, para servir de suporte ao o pouso da fêmea. Estes tubos foram tampados com tecido de nylon preso por um tampa plástica onde havia um furo em seu meio, por onde um chumaço de algodão embebido com solução de açúcar a 10% foi introduzido para servir como fonte energética.

Figura 4. Tubo de acrílico para obtenção de desova das fêmeas grávidas

Fonte: GALVIS (2011)

4.5. Transferência dos ovos e seguimento das formas imaturas

Após a oviposição, morte das fêmeas e identificação destas segundo Galati (2003), os ovos foram transferidos com pinceis úmidos para placa de Petri contendo uma camada de gesso no fundo. Os ovos da mesma espécie foram agrupados e seguidos diariamente. O alimento foi oferecido um dia antes da eclosão das larvas.

4.6. Obtenção dos parâmetros de sobrevivência, período do ciclo gonotrófico, taxa do 1º repasto sanguíneo e os subsequentes

4.6.1. Sobrevivência

No insetário, as fêmeas foram alimentadas em hamsters para se obter as desovas. As fêmeas ingurgitadas foram separadas individualmente em frascos adaptados. Estes continham gesso úmido no fundo e uma faixa de papel de filtro de modo a servir de suporte para pouso das fêmeas. Após a desova, as fêmeas foram identificadas e os ovos da mesma espécie foram agrupados em placas de plástico (7,5 cm de diâmetro por 3 cm de altura) com gesso no fundo e tampa. As placas com os ovos foram mantidas em umidade próxima a 85% e temperatura $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A cada dia de emergência, os adultos foram separados em gaiolas para o acompanhamento da sobrevivência. Em todas as gaiolas, a partir da emergência dos adultos, foi colocado um pedaço de maçã como fonte de alimentação açucarada. Decorridas 48 horas da emergência das fêmeas, foi colocado um hamster anestesiado para servir de fonte alimentar sanguínea. A anestesia foi realizada por injeção intramuscular nas patas traseiras com uma dose para um hamster de aproximadamente 200 g, de 0,2 ml de cloridrato de ketamina e 0,05 ml de cloridrato de xilazina, ambos a uma diluição de 10%. O tempo máximo de exposição do hamster foi de uma hora. As fêmeas que se alimentaram foram transferidas para uma gaiola separada até a proximidade da data de oviposição, depois foram capturadas e mantidas em frascos isolados. Após a oviposição, aquelas que sobreviveram foram expostas para novo repasto sanguíneo. As gaiolas e os frascos foram inspecionados todos os dias para a coleta dos espécimes que morreram. Os dados foram passados para uma planilha para a confecção da tabela de vida, segundo (CAREY, 1993).

4.6.2. Período do ciclo gonotrófico

A estimativa desse parâmetro foi realizada por meio do acompanhamento das fêmeas alimentadas com sangue que foram individualizadas em tubos de acrílicos, como descritos anteriormente. Cada tubo foi rotulado com a data de alimentação sanguínea e a data de oviposição. Após a identificação das fêmeas, uma planilha para cada espécie foi construída com estas informações e estimou-se a mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição.

4.6.3. Taxa do 1º repasto sanguíneo

Após a eclosão das fêmeas de laboratório em torno de dois dias e também após a coleta de fêmeas silvestres, hamsters infectados pela *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1995/M15280; cedidos por C. Gomes, uma das colaboradoras do projeto) foram anestesiados com uma dose ketamina+xilazina conforme especificado no item 4.6.1 e expostos por um período de uma hora. Os hamster foram cobertos com tecido de meia de nylon expondo as partes próximas às patas onde se encontravam as feridas. Os insetos foram alimentados diretamente na ferida ou nos arredores da mesma, tentando garantir o maior aproveitamento.

Figura 5. Fêmeas de flebotomíneos alimentando-se em hamster infectivo

Foto cedida por F. GALVIS

5. Investigação da taxa de infecção experimental por *L. braziliensis* e período de incubação extrínseca

Fêmeas de 1ª geração foram obtidas como acima descrito. As fêmeas foram soltas em gaiolas após de 48 horas da emergência, na qual foi colocado um hamster infectado por *L.(V.) braziliensis* anestesiado como acima descrito, durante 1 hora. O hamster foi sedado e coberto com tecido de meia de nylon expondo as partes próximas às patas onde se encontravam as feridas; os insetos foram alimentados diretamente na ferida ou nos arredores da mesma. Doze horas depois, as fêmeas alimentadas foram agrupadas em uma gaiola. Essa exposição foi repetida várias vezes, até que todas as fêmeas se alimentassem ou morreram. As gaiolas foram revisadas diariamente, no mesmo horário, registrando-se a mortalidade por contagem direta.

A dissecação das fêmeas foi realizada em solução salina sob um microscópio estereoscópico a aumento de 60x, expondo-se o intestino e genitália. Uma lamínula foi colocada sobre a amostra, que foi examinada sob microscópio óptico ao aumento de 400x para identificação da espécie do flebotomíneo (por meio das espermatecas) e observação da infecção, pela presença de flagelados no tubo digestório. A dissecação das fêmeas foi feita na medida em que iam morrendo.

6. Forma de análise dos dados

Sobrevivência. Por meio da estimativa horizontal. Foi calculada a tábua de vida segundo método de CAREY (1993) onde:

x , é a idade em dias;

l_x , proporção de sobreviventes na idade x ;

$d_x = l_x - l_{x+1}$; a diferença no número de sobreviventes para sucessivas idades x e $x+1$

$p_x = l_{x+1}/l_x$; probabilidade de sobrevivência na idade x a $x+1$

$q_x = 1 - p_x$; probabilidade de morte no período x a $x+1$;

$q_x = d_x/l_x$, ou $l_x - l_{x+1}/l_x$; ou $1 - (l_{x+1}/l_x)$

A probabilidade média de sobrevivência será $L_x = (l_x - 1/2 d_x)$; ou $(l_x + l_{x+1})/2$

A esperança de vida (ex) estimada por T_x/l_x .

O número total de dias restantes aos sobreviventes até a idade máxima w , T_x , será

estimado por: $\sum_{y=x}^w L_y$

A taxa de infecção experimental de cada uma das espécies de flebotomíneos foi dada pelo número de fêmeas com a presença de *L. (V.) braziliensis* no total das que se alimentaram.

As taxas das fêmeas com infecção que são realmente infectantes foi dada pelo nº de fêmeas com formas infectantes (metacíclicas), no total das fêmeas encontradas com flagelados na dissecação.

O período de incubação extrínseca foi obtido de acordo com a mediana do dia que surgiram as formas infectantes (metacíclicas) no tubo digestório torácico das fêmeas.

A expectativa de vida infectiva foi obtida pela tabela de vida das fêmeas que fizeram o repasto no hamster infectado, no dia mediano do período de incubação extrínseca.

De posse dessas informações foi calculada a capacidade vetora para cada uma das espécies, empregando-se a fórmula utilizada por MACDONALD (1952) e adaptada por REISEN (1989), conforme, a seguir:

$$V = m a b P^n / -\log P$$

m = densidade de fêmeas atraídas a hamster por tempo de exposição (dado de campo);

a = proporção de fêmeas que se alimentaram em hamster/duração mediana do ciclo gonotrófico;

b = proporção de fêmeas que se infectaram e que são realmente infectantes;

p = probabilidade de sobrevivência diária do vetor;

n = período mediano de incubação extrínseca.

e_o = Expectativa de Vida = $1 / -\log_e P$

e_{inf} = Expectativa de vida infectiva = $P^n / -\log_e P$

ou seja,

$$V = m a b e_{inf}$$

7. Aspectos da Ética Animal

Os hamsters utilizados nos experimentos foram anestesiados (0,05 ml xilazina 10% + 0,2ml ketamina 10%) antes de serem expostos ao flebotomíneos "limpos" e permaneceram expostos uma hora por dia, em dias alternados. Quando despertos da anestesia foram mantidos em suas caixas, em repouso com água e alimento *ad libidum*.

Nas capturas com armadilhas de Disney foram utilizados quatro hamsters "limpos" a cada mês, dois em Embu e dois em Iporanga, que ficaram expostos diariamente.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal, da Faculdade de Medicina da USP, aprovado com o número de processo CEP-IMT 057/2009 e da Faculdade de Saúde Pública da USP e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP, segundo o protocolo de pesquisa número 2026 (ANEXOS 2 e 3)

8. Biossegurança

O insetário do laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae apresenta vedação para impedir a saída de flebotomíneos. O pessoal que manipulou os insetos estavam devidamente vestido e calçado.

Os hamsters submetidos ou não à picada de insetos infectados foram mantidos em segurança. Quando sacrificados, o descarte será feito segundo às normas de segurança da FSP.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Biossegurança da Faculdade de Saúde Pública (em dezembro de 2009) (Anexo 4).

O projeto foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade obtida em 15 de junho de 2010 Nº 22399-1.

O projeto contou com financiamento Fapesp, processo 2009/53414-1 e do CNPQ, processo nº 306457/2011-3.

9. Resultados

9.1. Densidade de flebotomíneos em relação ao hamster

Esse parâmetro foi obtido por meio de armadilhas de Disney instaladas em dois municípios do Estado de São Paulo, Iporanga e Embu, foram instaladas duas armadilhas em cada localidade.

Em Iporanga foram coletados um total de 72 (58 machos e 14 fêmeas) espécimes pertencentes a sete espécies. Do total de espécimes capturados, 58 são de *Ny. intermedia*, dos quais, apenas 5 são fêmeas. Para *Pi. fischeri* foram capturados 2 exemplares e ambos são fêmeas.

No município de Embu foram obtidos 32 espécimes (10 machos e 22 fêmeas) pertencentes a quatro espécies, Do total de espécimes 19 são de *Pi. fischeri*, sendo 13 fêmeas

Na tabela (1) abaixo é possível observar a presença da espécie *fischeri* nas duas localidades, porém sua presença no município do Embu é mais expressiva. E o número de fêmeas coletadas no Embu também foi mais elevado que em Iporanga, o que acarreta um valor de **m** maior para Embu. O valor de **m** em Iporanga foi de 0,027 fêmeas/hamster/noite para *Ny. intermedia* e 0,011 fêmea/hamster/noite para *Pi. fischeri*. No Embu, para *Pi. fischeri* foi de 0,103 fêmea/hamster/noite . Portanto para esta espécie no município de Iporanga o **m** foi bem inferior ao observado no município de Embu.

Tabela 1- Número de flebotomíneos, segundo espécie, sexo, local e dias de coletas, capturados em armadilhas de Disney contendo um hamster e valor de **m** (nº de fêmeas/hamster/noite).

Espécie	Local	Iporanga			Embu		
	Dias de exposição	183			126		
	sexo	♂	♀	m	♂	♀	m
<i>Ev. edwardsi</i>		-	-	-	3	8	0,063
<i>Ex. firmatoi</i>		-	1	0,005	-	1	0,008
<i>Mg. migonei</i>		1	-	-	-	-	-
<i>Ny. intermedia</i>		53	5	0,027	-	-	-
<i>Ny. neivai</i>		1	1	0,005	-	-	-
<i>Pa. sp1.</i>		-	-	-	1	-	-
<i>Pa. pascalei</i>		3	2	0,011	-	-	-
<i>Pa. sp2.</i>		-	3	0,016	-	-	-
<i>Pi. fischeri</i>		-	2	0,011	6	13	0,103
Total		58	14	0,077	10	22	0,175

9.1.1. Nova armadilha

Durante as coletas com a armadilha Disney surgiu uma dúvida em relação a sua eficácia, por esse motivo optou-se por testar essa nova armadilha no Município de Iporanga, o que possibilitou chegar a um outro valor de **m** e, conseqüentemente, a outro valor da capacidade vetorial para as duas espécies.

Tabela 2. Número de flebotomíneos s espécies *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri* capturados com a armadilha CDC modificada segundo sexo e presença de isca, no Município de Iporanga, 26 de maio a 01 de junho de 2012

Espécies	Hamster	<i>Ny. intermedia</i>				<i>Pi. fischeri</i>			
		com		sem		com		sem	
		3	2	3	2	3	2	3	2
Nº armadilhas	sexo	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
26/27		125	80	-	-	-	-	-	-
27/28		227	90	4	2	-	1	-	-
28/29		81	24	191	16	-	-	-	-
29/30		106	43	86	22	-	-	-	-
30/31		387	32	96	47	-	1	-	-
31/01		4	5	-	-	-	-	-	-
Total de insetos		930	274	377	87	-	2	-	-
Total armadilhas		18	18	12	12	18	18	12	12
Média/armadilha		51,	15,2	31,4	7,3	-	0,11	-	-

A subtração das médias das armadilhas sem hamsters daquelas com hamsters (tabela 2) fornece a atratividade do hamsters para as fêmeas. Em relação às fêmeas

de *Ny. intermedia*, tem-se: $15,2 - 7,3 = 7,9$ fêmeas sendo atraídas por hamsters por dia (**m**). Para *Pi. fischeri* esse valor é de **0,11** fêmeas atraídas por hamsters por dia.

9.2. Observação das espécies estudadas

9.2.1. *Nyssomyia intermedia*

Tabela 3-Sobrevida das fêmeas de *Ny. intermedia* ingurgitadas em hamster infectado pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Classe de idade (dias) (x)	Intervalo de Idade (dias), x a x + 1	Número de Sobreviventes no Começo do intervalo k_x	Número de mortes No intervalo de idade D_x
0	0-1	46	3
1	1-2	43	3
2	2-3	40	3
3	3-4	37	6
4	4-5	31	7
5	5-6	24	18
6	6-7	6	5
7	7-8	1	1
8	8-9	—	—

A construção da tábua de vida foi realizada com os dados apresentados na tabela 3.

A expectativa de vida das fêmeas de *Ny. intermedia* após o repasto infectante no início da cultura foi de 4,51 dias. O número de mortes foi aumentando dia a dia, se mantendo uma sobrevivência acima de 50% no intervalo de 4-5 dias. O maior número de mortes, portanto, uma menor sobrevivência ocorreu no intervalo de 5-6 coincidindo com a mediana do ciclo gonotrófico, indicando a influência da oviposição na mortalidade das fêmeas. A mediana da sobrevivência após o repasto em hamster infectado foi de 6 dias.

Tabela 4. Tábua de vida de fêmeas de *Ny. intermedia* , após repasto sanguíneo em hamster infectado por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Classe de idade (dias) (x)	Proporção de sobreviventes na idade x, l_x	Proporção de sobreviventes da idade x a x+1, p_x	Proporção de mortes x a x+1, q_x	Proporção de mortes no intervalo x a x+1, d_x	Dias vividos no intervalo L_x	Dias vividos desde a idade x, T_x	Expectativa de vida e_x
0	1,00	0,93	0,07	0,07	0,96	4,51	4,51
1	0,93	0,93	0,07	0,06	0,90	3,55	3,81
2	0,87	0,92	0,08	0,06	0,84	2,65	3,04
3	0,81	0,84	0,16	0,13	0,75	1,81	2,24
4	0,68	0,78	0,22	0,15	0,61	1,06	1,56
5	0,53	0,25	0,75	0,39	0,34	0,45	0,84
6	0,14	0,17	0,83	0,11	0,09	0,11	0,78
7	0,03	0,0	1,00	0,03	0,02	0,02	0,66
8	0,0	-	-	-	0,0	0,0	0,0

Negrito = expectativa de vida a partir do surgimento do período infectante.

9.2.2. *Pintomyia fischeri*

Tabela 5 - Sobrevida das fêmeas de *Pi. fischeri* ingurgitadas em hamster infectado pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Classe de idade (dias) (x)	Intervalo de Idade (dias), x a x + 1	Número de Sobreviventes no Começo do intervalo k_x	Número de mortes No intervalo de idade D_x
0	0-1	60	0
1	1-2	60	0
2	2-3	60	0
3	3-4	60	0
4	4-5	60	16
5	5-6	44	29
6	6-7	15	7
7	7-8	8	8
8	8-9	—	—

Os dados da tabela 5 foram utilizados para construção da tábua de vida dessa espécie.

Após o repasto sanguíneo infectante observou-se uma sobrevida inicial para essa espécie de 5,89 dias. A mortalidade dessas fêmeas teve início no intervalo de 4-5 dias, o maior número de mortes ocorreu entre o quinto e sexto dia ocorrendo uma mortalidade de quase 50% das fêmeas, coincidindo com a mediana do ciclo gonotrófico, sugerindo a influência da oviposição na mortalidade das fêmeas (figura 1). A mediana da sobrevivência após repasto infectante foi de 6 dias.

Tabela 6. Tábua de vida de fêmeas de *Pi. fischeri* , após repasto sanguíneo em hamster infectado por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* .

Classe de idade (dias) (x)	Proporção de sobreviventes na idade x, l_x	Proporção de sobreviventes da idade x a x+1, p_x	Proporção de mortes x a x+1, q_x	Proporção de mortes no intervalo x a x+1, d_x	Dias vividos no intervalo L_x	Dias vividos desde a idade x, T_x	Expectativa de vida e_x
0	1,00	1,00	0,0	0,0	1,00	5,89	5,89
1	1,00	1,00	0,0	0,0	1,00	4,89	4,89
2	1,00	1,00	0,0	0,0	1,00	3,89	3,89
3	1,00	1,00	0,0	0,0	1,00	2,89	2,89
4	1,00	0,74	0,26	0,0	1,00	1,89	1,89
5	1,00	0,34	0,66	0,75	0,62	0,89	0,89
6	0,25	0,53	0,47	0,11	0,2	0,27	1,08
7	0,14	0,0	1,00	0,14	0,07	0,07	0,5
8	0,0	-	-	0,0	0,0	0,0	0,0

Negrito = expectativa de vida a partir do surgimento do período infectante.

9.3. Comparação das espécies envolvidas no estudo

9.3.1 Proporção de fêmeas que se alimentaram no hamster (AI)

No experimento de alimentação da espécie *Ny. Intermedia*, foram liberadas na gaiola 68 fêmeas, dessas 46 se alimentaram, obtendo-se uma taxa de alimentação de 67,6%. Para a espécie *Pi. fischeri* foram liberadas 172 fêmeas, dessas 133 se alimentaram, chegando a uma taxa de alimentação de 77,3 % (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de machos e fêmeas expostos a hamster infectado pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Espécie	<i>Ny. intermedia</i>	<i>Pi. fischeri</i>
Fêmeas	68	172
Machos	99	45
Fêmeas alimentadas	46	133
Proporção de Fêmeas alimentadas	67,6%	77,3%

9.3.2. Duração do Ciclo gonotrófico

O valor da mediana do ciclo gonotrófico foi de cinco dias para as espécies estudadas (Tabela 8). Porém os valores máximo, mínimo e a diferença entre esses valores diferem, sendo menor para *Pi. fischeri*.

Tabela 8 -Duração do ciclo gonotrófico em condições de laboratório de *Ny. intermedia* e de *Pi. fischeri*.

Espécie	N	Mínima (dias)	Máxima (dias)	Mediana (dias)
<i>Ny. intermedia</i>	48	4	7	5
<i>Pi. fischeri</i>	46	5	6	5

9.3.3. Hábito de picar o hamster

Os valores da taxa de alimentação utilizados na construção da tabela 9 são os mesmos da proporção de fêmeas alimentadas da tabela 7.

Na tabela 9 encontra-se o valor de **a** para as duas espécies sob investigação, os valores de **a** encontrados apontam que, em média, para *Ny. intermedia*, uma fêmea se alimenta em fonte de infecção a cada 7,7 dias (1,0/0,13), ao passo que para espécie *Pi. fischeri* uma fêmea se alimenta em fonte de infecção a cada 6,7 dias (1,0/0,15).

Tabela 9 - Estimativa do parâmetro “a” para as espécies sob investigação

Espécie	Taxa de alimentação	Ciclo gonotrófico (mediana)	a
<i>Ny. intermedia</i>	0,67	5	0,13
<i>Pi. fischeri</i>	0,77	5	0,15

9.3.4. Período de incubação extrínseca (n)

Nos experimentos realizados com *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri*, para ambas as espécies a forma infectante do parasita só foi notada no quinto dia após alimentação da fêmea na fonte de , essa investigação foi realizada após a dissecação com a morte natural da fêmea (Tabela 10).

Tabela 10. Infecção experimental de flebotomíneos provenientes de Iporanga e Embu em hamster infectado por *L. braziliensis*, segundo espécie de flebotomíneo, e horas pós-repasto sanguíneo.

Período pós- repasto	Município Espécie Condição♀	Embu		Iporanga				Total	
		<i>Pi. fischeri</i> Dissec	<i>Pi. fischeri</i> Inf	<i>Pi. fischeri</i> Dissec	<i>Pi. fischeri</i> Inf	<i>Ny. intermedia</i> Dissec	<i>Ny. intermedia</i> Inf	Dissec	Inf
24 horas		...	...	...	...	...	...	...	...
48 horas		...	...	...	...	...	...	...	...
72 horas		4	2	...	...	1	0	5	2
96 horas		9	2	1	0	37	0	47	2
120 horas		18	10*	2	1*	73	8*	93	19*
144 horas		29	9*	0	0	8	2*	37	11*
168 horas		25	3*	0	0	2	2*	27	5*
Total		85	26	3	1*	121	12*	209	39
Total infectantes*			22*		1*		12*		35*

Dissec = Dissecção, Inf = Infecção

9.3.5. Proporção de fêmeas com formas infectantes entre as fêmeas infectadas (b)

Para *Ny. intermedia* foram ingurgitadas 151 fêmeas em hamster infectado, dessas, 20 estavam infectadas e 18 delas apresentaram a forma infectante (promastigota metacíclica) do parasita. Desse modo a taxa de infecção observada foi de 13,2% e proporção de fêmeas com forma infectante foi de 90 (Tabela 11).

Em se tratando de *Pi. fischeri* das 148 fêmeas alimentadas em hamsters infectados, 46 (31,1%) apresentaram flagelados no tubo digestivo, em 27 delas (59,0%) foram observadas as formas promastigotas metacíclicas.

Tabela 11- Proporção de fêmeas de *Nyssomyia intermedia* e *Pintomyia fischeri* com infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Espécie	Fêmeas ingurgitadas	Fêmeas infectadas	Taxa de infecção	
			Dissecção	b Proporção de fêmeas infectadas com forma infectantes
<i>Ny. intermedia</i>	151	20	0,13	0,90 (18/20)
<i>Pi. fischeri</i>	148	46	0,31	0,59 (27/46)

9.3.6. Expectativa de vida infectiva (e_i)

O valor desse parâmetro foi obtido a partir da tábua de vida construída com fêmeas alimentadas em hamster infectado por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* das duas espécies de flebotomíneos envolvidas na pesquisa.

Para *Ny. intermedia* a expectativa de vida infectiva foi de 0,84 dias e para *Pi. fischeri* foi de 0,89 dias (Tabela 12).

Tabela 12-Expectativa de vida para as coortes das espécies de flebotomíneos seguidas a partir do repasto sanguíneo em hamster infectado por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

Espécie	n	Expectativa de vida após o repasto
<i>Ny. intermedia</i>	46	0,84
<i>Pi. fischeri</i>	109	0,89

9.3.7. Capacidade Vetorial

Tabela 13- Resumo dos parâmetros usados na estimativa da capacidade vetorial das espécies envolvidas no estudo

Parâmetro	<i>Ny. intermedia</i>	<i>Pi. fischeri</i>
m (fêmeas/hamster/dia)	0,027	0,103
a [taxa de repasto/CG (dias)	0,13	0,15
n (incubação extrínseca)	5	5
b (proporção de ♀ infectantes)	0,90	0,59
e_{inf} [expectativa de vida infectiva (dias)	0,84	0,89

Com essas estimativas foi calculada a capacidade vetorial para as duas espécies segundo a fórmula:

$$V = m a b e_{inf}$$

9.3.7.1. *Nyssomyia intermedia* (Armadilha Disney- Iporanga)

$V_{Ny.i.} = (0,027 \text{ fêmeas/hamster/dia}) \frac{0,67}{5} (0,90)(0,84 \text{ dias}) = \mathbf{0,0027}$ novas infecções por dia de exposição a um hamster infectado

Esse valor sugere que com uma taxa de repasto no hospedeiro de 67% da população de fêmeas de *Ny. intermedia* e levando em conta que das fêmeas alimentadas 90% delas desenvolvem as formas infectantes do parasita, apresentando uma densidade em relação fonte de infecção (fêmeas/hamster/dia) de 0,027, e uma taxa de contato (1,0/a) de 7,7, dias estima-se que a população de fêmeas da área consiga produzir 0,0027 novos casos de infecção por dia de exposição a fonte de infecção.

9.3.7.2. *Nyssomyia intermedia* (Nova armadilha - Iporanga)

No cálculo da capacidade para utilizando os dados da nova armadilha o único parâmetro que muda é o da densidade em relação ao hamster.

$V_{Ny.i.} = (7,9 \text{ fêmeas/hamster/dia}) \frac{0,67}{5} (0,90)(0,84 \text{ dias}) = \mathbf{0,8}$ novas infecções por dia de exposição a um hamster infectado

Esse valor sugere que com uma taxa de repasto no hospedeiro de 67% da população de fêmeas de *Ny. intermedia* e levando em conta que das fêmeas alimentadas 90% delas desenvolvem as formas infectantes do parasita, apresentando uma densidade em relação fonte de infecção (fêmeas/hamster/dia) de 7,9, e uma taxa de contato (1,0/a) de 7,7, dias estima-se que a população de fêmeas da área consiga produzir 0,8 novos casos de infecção por dia de exposição a fonte de infecção.

9.3.7.3. *Pintomyia fischeri* (Armadilha Disney – Iporanga)

$$V_{Pi.f.} = (0,011 \text{ fêmeas/hamster/dia}) \frac{0,77}{5} (0,59)(0,89 \text{ dias}) = \mathbf{0,00089}$$
 novas infecções por dia de exposição a um hamster infectado

O valor encontrado sugere que uma população de fêmeas de *Pi. fischeri* com taxa de repasto de 77%, uma taxa de fêmeas com forma infectante do parasita de 59%, apresentando uma densidade em relação fonte de infecção de 0,011 fêmeas/hamster/dia e uma taxa de contato de 6,7 dias, pode conseguir produzir 0,00089 novos casos de infecção pro dia de exposição a fonte de infecção.

9.3.7.4. *Pintomyia fischeri* (Nova armadilha – Iporanga)

$$V_{Pi.f.} = (0,11 \text{ fêmeas/hamster/dia}) \frac{0,77}{5} (0,59)(0,89 \text{ dias}) = \mathbf{0,0089}$$
 novas infecções por dia de exposição a um hamster infectado

Com base nesse resultado é possível sugerir que com uma taxa de repasto de 77% da população de fêmeas de *Pi. fischeri*, uma taxa de fêmeas com forma infectante do parasita de 59%, apresentando uma densidade em relação fonte de infecção de 0,11 fêmeas/hamster/dia e uma taxa de contato de 6,7 dias, estima-se que a população de fêmeas da área consigam produzir 0,0089 novos casos de infecção pro dia de exposição a fonte de infecção.

9.3.7.5. *Pintomyia fischeri* (Disney - Embu)

$V_{Pi.f.} = (0,103 \text{ fêmeas/hamster/dia}) \frac{0,77}{5} (0,59)(0,89 \text{ dias}) = \mathbf{0,0083}$ novas infecções por dia de exposição a um hamster infectado

O resultado encontrado sugere que com uma taxa de repasto de 77% da população de fêmeas de *Pi. fischeri*, uma taxa de fêmeas com forma infectante do parasita de 59%, apresentando uma densidade em relação fonte de infecção de 0,103 fêmeas/hamster/dia e uma taxa de contato de 6,7 dias, estima-se que a população de fêmeas da área consigam produzir 0,0083 novos casos de infecção pro dia de exposição a fonte de infecção.

9.3.8. Comparação da Capacidade Vetorial das espécies envolvidas no estudo

Com os resultados encontrados é possível afirmar que a capacidade vetorial das espécies sob investigação difere quanto à armadilha utilizada para estimar a variável **m** (densidade das fêmeas em relação ao hamster).

A capacidade vetora de *Ny. intermedia* em Iporanga para a nova armadilha é 296,3 vezes maior que para a armadilha de Disney. Comparando a capacidade vetora de *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri* ambas para a armadilha nova, a capacidade vetora de *Ny. intermedia* é 89,9 vezes maior que a de *Pi. fischeri*, a capacidade vetora de *Ny. intermedia* se mantém superior 3,03 vezes a capacidade de *Pi. fischeri* quando se compara as duas espécies com armadilha Disney em Iporanga.

O valor da capacidade vetorial de *Pi. fischeri* encontrado para as duas armadilhas no município de Iporanga difere muito, sendo o da nova armadilha 10 vezes maior do que o da Disney. No município de Embu com a armadilha Disney a capacidade vetora de *Pi. fischeri* é 9,3 vezes superior à Disney em Iporanga.

Quando se observa os resultados encontrados com a mesma armadilha (Disney) em Iporanga para *Ny. intermedia* e Embu para *Pi. fischeri* a capacidade vetora de *Pi. fischeri* é 3,07 vezes maior que a de *Ny. intermedia*.

10. Discussão

10.1. Densidade das espécies de flebotomíneos envolvidas no estudo em relação ao hamster

Com a exposição das armadilhas de Disney e da Nova armadilha (testada apenas no município de Iporanga) na tentativa de obter o parâmetro m para estimativa da capacidade vetorial para as duas espécies sob estudo. Com a armadilha Disney no município de Iporanga obteve-se um m de 0,027 para *Ny. intermedia* e 0,0011 para *Pi. fischeri*; com a nova armadilha esses valores foram 7,9 e 0,11 respectivamente. Já no Município de Embu o valor encontrado foi de 0,103 para *Pi. fischeri*. É possível observar o baixo desempenho da armadilha Disney quando comparada com a nova armadilha. O maior rendimento de *Ny. intermedia* em relação ao de *Pi. fischeri*, tanto na Disney como na nova armadilha no município de Iporanga, corroboram a densidade muito desigual entre essas duas espécies encontrados por GALATI et al. (2009,2010).

Existem várias formas de se obter esse parâmetro e é ideal que ele seja obtido na área de estudo para se chegar ao valor que corresponda à realidade da localidade. É necessário avaliar diversas formas de capturas para compreender de maneira mais clara a dinâmica vetor-parasita-hospedeiro (ALEXANDER, 2000).

Disney, em 1966, afirma que é mais fácil capturar flebotomíneos picando o homem ao se aproximar das armadilhas que conseguir flebotomíneos atraídos pelos roedores expostos nas mesmas e que pesquisadores do Gorgas Laboratório (1963, 1964) desenvolveram uma pesquisa em campo testando vários tipos de armadilhas com os mais diferentes tipos de animais vivos, para verificar a atratividade de flebotomíneos. Porém poucos flebotomíneos foram capturados em qualquer uma das armadilhas (não mais que um ou dois).

Biancardi e Castellón (2000) utilizando várias formas de coleta em seu trabalho constatou que a armadilha de Disney se mostrou a menos eficiente quanto ao número de espécimes como também na diversidade de espécies encontradas, a maneira que se mostrou mais eficiente foi a Shannon.

Dorval et al. (2007) usando a Disney modificada relata que 59,6% dos insetos coletados foram com essa armadilha, porém eles ressaltam que a armadilha Disney modificada ficou exposta constantemente enquanto as outras foram expostas periodicamente e só durante a noite.

É difícil mensurar parâmetros entomológicos em se tratando de flebotomíneos, pois seu comportamento é altamente influenciado por fatores ambientais e por ações humanas (CAMARGO – NEVES, et al., 2002), como também a fauna e a flora de cada região interferem no perfil epidemiológico das leishmanioses (BRASIL, 2007).

10.2. Hábito de Picar o hospedeiro (a)

Utilizando a metodologia de anestesiamento do hamster para se obter esse parâmetro, estimou-se um valor de *a* para *Ny. intermedia* de 7,7 dias e para *Pi. fischeri* de 6,7 dias. Isso quer dizer que uma fêmea de *Ny. intermedia* se alimentará em uma fonte de infecção a cada 7,7 dias e uma da espécie *Pi. fischeri* se alimentará a cada 6,7 dias, ou seja, esses valores encontrados indicam o contato dos insetos com os possíveis hospedeiros. Já que o hábito de picar o hospedeiro é expresso pela frequência média com que uma fêmea do inseto pica o hospedeiro, ou seja, é a frequência de alimentação da fêmea (GARRET- JONES, 1964).

Existem várias maneiras de verificar o padrão alimentar desses insetos como teste de ELISA, reação de precipitina dentre outros. MUNIZ et al. (2006) em seu estudo sobre hábito alimentar de flebotomíneos conclui que a espécie *Pi. fischeri* é oportunista e suas fêmeas ajustam seus hábitos alimentares de acordo com a disponibilidade de hospedeiros, corroborando com CASANOVA (2001).

Pesquisas realizadas por RANGEL et al. (1986, 1990) e por Gomes et al. (1983) utilizam iscas animais para captura associando ao hábito alimentar eles também concluíram que esses insetos possuem um hábito alimentar bastante variado de acordo com a disponibilidade de hospedeiros. DIAS-SVERSUTTI et al. (2007) utilizando diferentes animais como isca não constatou diferenças significativas no número de fêmeas encontradas sugerindo um ecletismo em relação a preferência alimentar desses insetos.

Parâmetro de extrema importância na estimativa da capacidade vetorial desses insetos, uma vez que espécies com intervalo menor de dias para o contato com uma nova fonte de alimento atuaram de maneira mais eficiente na transmissão do parasita uma vez que estejam infectadas. Segundo GARRET – JONES (1964) uma estratégia epidemiológica que poderia ser adotada na tentativa de evitar o acometimento das pessoas por leishmaniose seria tentar diminuir a expectativa de vida de vetores encontrados alimentados ou sugando sua fonte de alimento.

10.3. Taxas de infecção experimental e proporção de fêmeas infectadas que realmente são infectantes (b)

No bioensaio de infecção experimental realizado para as duas espécies envolvidas no presente estudo, obteve-se uma taxa de fêmeas infectadas para *Ny. intermedia* de 13,2% e para *Pi. fischeri* de 31,1%, resultado com taxas de infecção superiores ao obtido por GALVIS (2011) que encontrou a uma taxa de infecção de menos de 5% para *Pi. fischeri* e *Lu. longipalpis* expostos a cão infectado por *Leishmania infantum chagasi*.

Seguindo a metodologia do presente estudo, PAIVA et al. (2007) conseguiram alimentar 26 espécimes da espécie *Ny. intermedia*. Destas apenas uma apresentou infecção detectada por PCR. Utilizando a técnica de alimentação artificial, PAIVA et al. (2007) chegou a uma taxa de 89% de infecção, dos insetos dissecados 75% deles apresentaram presença de flagelado no tubo digestivo.

REIS et al. (2010) submetendo fêmeas da espécie *Ny. whitmani* a camundongos infectados por *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis* chegou a uma taxa de infecção de 65,2% e 47,4% respectivamente, usando técnicas moleculares para a análise dos espécimes submetido a infecção. Esses valores supõem que *Ny. whitmani* é mais susceptível a infecções por *Leishmania braziliensis*. Já SILVA e GOMES (2001) submeteram uma população de *Ny. intermedia* silvestre a hamster infectado por *Leishmania braziliensis* e usando a técnica da dissecação para observação da infecção, encontraram um percentual de 76,1% de positividade para as fêmeas examinadas.

Em se tratando das fêmeas infectadas que realmente são infectantes (b), ou seja, que chegaram a desenvolver a forma promastigota metacíclica do parasita ou forma infectante a animais vertebrados, tem-se uma proporção de 90% para os espécimes avaliados de *Ny. intermedia* e 59% para os de *Pi. fischeri*, isso quer dizer que das fêmeas que conseguiram se infectar durante a alimentação 90% das de *Ny. intermedia* chegaram a desenvolver forma flagelada infectante do parasita e apenas 59% das de *Pi. fischeri* conseguiram completar o ciclo do parasita. Apesar da taxa de infecção de *Pi. fischeri* ter sido superior a de *Ny. intermedia* a taxa de fêmeas realmente infectantes desta espécie foi superior à de *Pi. fischeri*, e são essas fêmeas responsáveis por levar a infecção adiante.

O ciclo de vida desse parasita é muito complexo e a interação parasita-vetor ainda não está totalmente esclarecida. O parasita passa por várias barreiras físico-químicas no intestino do vetor para completar seu ciclo e se manter na natureza (PIMENTA et al., 2012). Outra dificuldade encontrada na observação da infecção das fêmeas expostas à alimentação em fonte infectante foi a baixa sobrevivência do parasita após a morte do vetor, levando possivelmente a uma subestimação das fêmeas com parasita e realmente infectantes, uma vez que a disseção foi feita após a morte das fêmeas, frequentemente durante a noite. Esta baixa sobrevivência dos parasitas parece resultar de sua degradação por bactérias, uma vez que em muitas das fêmeas com infecção não detectada a proliferação das bactérias era muito grande.

10.4. Período de Incubação extrínseca (n)

Período de incubação extrínseca é o tempo que leva entre a alimentação do inseto vetor em fonte de infecção até o surgimento da forma infectante do parasita. Esse parâmetro é essencial para se chegar ao período de vida infectiva da população de fêmeas infectadas (MEYER, 1989). Para ambas as espécies, este período foi de 5 dias, coincidindo com a mediana do ciclo gonotrófico. Condição esta que favorece a capacidade vetora, pois é quando a fêmea busca um novo repasto sanguíneo, e dessa maneira transmitiria os parasitas.

A relação parasita hospedeiro é muito delicada, e essa interação ainda pode variar de acordo com a espécie de leishmânia e flebotomíneo envolvidos. Além disso, existe influência da saliva no estabelecimento da infecção e as inúmeras barreiras que os parasitas precisam ultrapassar para conseguir sucesso no seu ciclo de desenvolvimento (SACKS e KAMHAWI, 2001; PIMENTA et al., 2012).

10.5. Expectativa de vida infectiva do vetor

Expectativa de vida das espécies envolvidas no estudo foi estimada em laboratório. O que possibilitou uma avaliação diária da mortalidade das mesmas após o repasto em hamster infectante. Com base da tabela de vida construída para *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri* chegou-se a uma expectativa de vida de 0,84 para *Ny. intermedia* e 0,89 para *Pi. fischeri* e mediana de vida infectiva de 6 dias para as duas espécies. A expectativa de vida das duas espécies não difere muito, mas é possível observar que as fêmeas de *Pi. fischeri* apresentam uma pequena vantagem em relação às de *Ny. intermedia*, ou seja, isso indica que as de *Pi. fischeri* teriam uma chance maior de entrar em contato com um hospedeiro, porém esse período curto de vida infectiva sugere a necessidade de uma alta densidade desses insetos para levar a infecção adiante.

A mortalidade nas duas espécies apresentam uma sensível diferença, para *Ny. intermedia* foi possível observar que sua mortalidade começa desde os primeiros dias da alimentação em hamster infectado, em se tratando de *Pi. fischeri* essa mortalidade se inicia após 5 dias de alimentação, porém as duas tem o seu

maior pico próximo a mediana do ciclo gonotrófico que foi de 5 dias para as duas espécies.

Nas observações realizadas o tempo máximo de sobrevivência para as fêmeas de *Ny. intermedia* e de *Pi. fischeri* após o repasto infectante foi 8 dias, o mínimo foi de 1 e 5 dias respectivamente.

A expectativa de vida de fêmeas de flebotomíneos pode ser mensurada através de observações realizadas diretamente em campo, com captura dos insetos, marcação com pó fluorescente, soltura dos mesmos no meio ambiente e recaptura (estimativa horizontal), ou de maneira vertical usando a taxa de fêmeas multíparas e o período do ciclo gonotrófico. Em laboratório a expectativa de vida dessas fêmeas pode ser acompanhada diariamente, observações às fêmeas em intervalo de tempo controlado até a morte de toda população (MILBY e REISEN, 1989; CAREY, 1993; CASANOVA, et al., 2009).

Casanova et al. (2009) através de trabalhos realizados em campo com captura- marcação –soltura e recaptura chegou a uma sobrevivência máxima de 11 dias para fêmeas de *Ny. intermedia*. Em acompanhamento de uma coorte de fêmeas em laboratório Galvis (2011) estimou um tempo médio de vida para *Pi. fischeri* de 0,74 dias.

A manutenção de uma coorte de fêmeas alimentadas em laboratório é uma tarefa extremamente delicada, já que é muito difícil reproduzir de maneira adequada o ambiente natural a que a mesma encontra-se adaptada, outro desafio é conseguir manter fêmeas vivas após o evento da oviposição, já que esse é um período crítico que leva a maior parte das fêmeas à morte.

10.6. Comparação da capacidade vetorial de *Ny. intermedia* e *Pi. Fischeri*

A estimação da capacidade vetorial envolve vários parâmetros ecológicos, que influencia de maneira decisiva nesse valor. A densidade do inseto, a capacidade de se infectar, a capacidade de desenvolver as formas infectantes, seu tempo de vida após repasto infectante dentre outros. Ao mensurar a capacidade vetorial, esse valor corresponde à determinada área de estudo e ao dado momento da observação, podendo variar de acordo com as condições encontradas nos momentos de coletas dados (GARRET – JONES 1954; REISEN, 1989).

Os fatores que poderiam estar envolvidos no surgimento de uma nova infecção foram agrupados e organizados por MACDONALD (1952) quando estudou a transmissão da malária. Mais tarde GARRET – JONES (1954) estruturou uma equação e o conceito de capacidade vetorial.

Em se tratando da transmissão de leishmaniose o conceito de capacidade vetora ainda é pouco explorado, já que o trabalho com flebotomíneos em laboratório não é uma tarefa fácil. No estudo desenvolvido buscando alcançar esse resultado a capacidade vetorial para *Ny. intermdia* (Iporanga) e *Pi. fischeri* (Embu) foram 0,0027 e 0,0083 respectivamente, quando utilizada a armadilha Disney para as duas espécies. Com a utilização da nova armadilha a capacidade vetorial de *Ny. intermedia* foi 96,3 vezes superior ao de *Pi. fischeri*.

Embora a de *Ny. intermedia* seja menor, quando se trata da armadilha Disney, a sua alta densidade observada no peridomicílio no Vale do Ribeira pode favorecê-la na transmissão da *Leishmania* em relação a *Pi. fischeri* Galati et al. (2009), o que é possível observar com o alto valor da capacidade vetorial de *Ny. intermedia* com o uso da nova armadilha. Por outro lado, *Pi. fischeri* parece ocupar nicho semelhante na região da Grande São Paulo (MOSCHIN, 2010). É possível observar que os valores da capacidade vetora das duas espécies difere muito, além disso, as duas espécies são adaptadas ao ambiente peridomiciliar, conseguindo se adaptar as transformações ocorridas com vegetação nativa ao longo do tempo.

Nyssomyia intermedia já foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania braziliensis* e *Pi. fischeri* já foi encontrada naturalmente infectada por

flagelados e já foi infectada em laboratório por *Leishmania* sp (PITA-PEREIRA et al., 2005; ROCHA et al., 2010; PESSOA e COUTINHO, 1941). É possível que exista o envolvimento de mais de uma espécie no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo e cada uma delas atuando de maneira decisiva onde se encontra em maior densidade e fácil acesso a fonte de infecção. *Ny. intermedia* para o município de Iporanga e *Pi. fischeri* para Embu. Resultado que corrobora CAMARGO – NEVES et . (2002) que afirma em seu trabalho não haver dúvida que existe mais de uma espécie vetora na transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo.

11. Conclusões

A expectativa de vida infectiva após alimentação em hamster infectante para *Pi. fischeri* foi superior a de *Ny. intermedia* em condições semelhantes de laboratório.

Nas mesmas condições de laboratório a mediana do ciclo gonotrófico foi igual para as duas espécies (5 dias).

Submetidas as mesmas condições de laboratório as duas espécies apresentaram uma alta taxa de alimentação em hamster infectante, sendo a taxa de alimentação de *Pi. fischeri* superior a de *Ny. intermedia*.

A taxa de infecção experimental também foi elevada, sendo a de *Pi. fischeri* superior à de *Ny. intermedia*, porém a taxa de fêmeas realmente infectantes de *Ny. intermedia* se sobressai em relação à de *Pi. fischeri*.

O período de incubação extrínseca observado para as duas espécies foi de 5 dias, coincidindo com a mediana do ciclo gonotrófico.

A capacidade vetora avaliada pela armadilha Disney e armadilha nova apresentaram diferenças. Para *Ny. intermedia* em Iporanga o valor da nova armadilha foi 296,3 vezes maior que o observado na Disney e para *Pi. fischeri* foi 10 vezes maior. Comparando a armadilha Disney em Iporanga o valor da capacidade vetora de *Ny. intermedia* foi 3,03 vezes superior ao de *Pi. fischeri*, e para nova armadilha foi 89,8 vezes maior que o de *Pi. fischeri*. Para *Pi. fischeri*, considerando a armadilha Disney o valor obtido para a capacidade vetora em Embu foi 9,3 vezes superior ao de Iporanga. A capacidade vetora de *Pi. fischeri* (Embu) foi 3,07 vezes maior que a de *Ny. intermedia* (Iporanga).

É provável que as duas espécies participem do ciclo de transmissão da LTA no estado de São Paulo. Em Iporanga, onde *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri* ocorrem em simpatria, *Ny. intermedia* atua mais intensamente que *Pi. fischeri*. No município de Embu, onde não se verificou a presença de *Ny. intermedia*, a população de *Pi. fischeri* apresentou capacidade vetora superior à de *Ny. intermedia* (Iporanga), quando avaliadas segundo o mesmo tipo de armadilha para obtenção da densidade vetora.

12. Referências

- Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sand flies. *Med. Vet. Entomol.* 2000, 14: 109-122.
- Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:597-601.
- Aragão HB. Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil Med.* 1922;36:129-130.
- Azevedo ACR, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lopes UG. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990;85:251.
- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for Parasitology.* 2007; 37: 1097-1106.
- Bailey MS, MRCP, Lockwood DNJ, BSC, MD, FRCP. Cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology.* 2007; 25: 203-211.
- Barretto MP. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1942.
- Barretto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1943.
- Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Ver Bras Epidemiol.* 2004;7:328-337.
- Biancardi CMB, Castellón EG. Flebotomíneos (DIPTERA: PSYCHODIDAE) no Estado de Mato Grosso, no Município de Chapada dos Guimarães, Brasil. *Acta Amazonica.* 2000; 30 (1): 115-128.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007. Disponível em: <http://portaldasaude.gov.br> (acesso em 26/01/2011).

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. 2006. Disponível em: <http://portaldasaude.gov.br> (acesso em 26/01/2011).
- Brito, MEA, Andrade, MS, Dantas-Torre F, Rodrigues, EHG, Cavalcanti, MP, Almeida, AMP, Brandão-Filho, SP. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 2012.
- Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JFL. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35:299-306.
- Carey JR. Applied demography for biologists. New York: Oxford University; 1993. 206p.
- Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACVMR, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector-Borne Zoon Dis*. 2008;8:407-414.
- Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Bol Dir Malariol San Amb*. 1995;35(Supl. 1):77-84.
- Casanova C, Costa IP, Natal D. Dispersal pattern of the sandfly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:719-724.
- Casanova C, Natal D, Santos FAM. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46:42-50.
- Cipa Group. Computer-aided Identification of Phlebotomine Sandflies of America. 1999. Disponível em :<http://cipa.snv.jussieu.fr> (acessado em 10/08/2009).
- Dejeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:305-318.
- Dias-Sversutti A de C, Scodro Rb de L, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia intermdia* (Pinto) e

- Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. Neotrop. Entomol. 2007; 36.
- Disney RHL. A Trap For Phlebotomine Sandflies Attracted To Rats. Bull. Ent. Res. 1966; 56:445-451.
- Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39:43-46.
- Dorval MEC, Alves PT, Oliveira AG, Brazil RP, Galati EAB. Modification of Disney trap for capture of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:877-878.
- Endris RG, Young DG, Butter JF. The laboratory biology of the sand fly *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1984;21:656-664.
- Forattini O P. Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 1973, 658 p.
- Forattini OP, Santos MR. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedium* Lutz & Neiva, 1912, por formas leptomonas, em um foco ativo de leishmaniose tegumentar americana. Arq Hig S Publ. 1952;17:171-174.
- Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1972;6:431-433.
- Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, organizadores, Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
- Galati EAB, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA Rocha HC & Garcia WB Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Pública. 1996;30:115-28.
- Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Gonçalves-Andrade RM, Naufel G. Attractiveness of black Shannon trap for Phlebotomines. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:641-647.
- Galati EAB, Marassá AM, Fonseca MB, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, & Bueno EFM. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district - area of hostels for tourists who visit the

- Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. Rev Bras Entomol. 2010; 54(4): 665-676.
- Galati EAB, Fonseca MB, Marassá AM, Bueno EFM. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1148-1158.
- Galvis F. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas [mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.
- Garrett-Jones C, Shidrawi GR. Malaria Vectorial Capacity of a Population of *Anopheles gambiae*. An Exercice in Epidemiological Entomology. Bull Wld Hlth Org. 1969;40:531-545.
- Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. An Bras Dermatol. 1992;67:55-60.
- Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Parasit. 1989;41:87-715.
- Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett T. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild animals and sandflies in the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med Parasit. 1991;44:645-661.
- Hoch A, Ryan L, Vexenat JA, Rosa ACOC & Barretto AC. Isolation of *Leishmania braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;(Suppl. 1):44.
- Iversson LB, Camargo ME, Silva EOR, Chieffi PP, Barros JAC. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1979;13:159-167.
- Iversson LB, Pires RBR, Ribeiro MA, Takeda AK, Escrivão-Jr A, Tolezano JE, Buralli GM. Investigação de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo. Rev. Saúde Pública. 1982;16:205-219.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends in Parasitology. 2006;22:439-445.

- Killick-Kendrick M, Killick-Kendrick R. The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia*. 1991;33 (Suppl. 1):315-320.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*. 1990;4:1-24.
- Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RSM, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil, XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1985;79:223-226.
- Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis, In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*, London, Sydney, Auckland; 2005. p.313-349.
- Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan- Amaz Saude*. 2010; 1(2):13-32.
- Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Dedet, A, Pandey A, Thomaz-Soccol V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil *Ann Trop Med Parasit*. 2000; 94:623–631.
- Marcondes CB, Bittencourt I A, Stoco PH, Eger I, Grisard EC e Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) sp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:1093-1097.
- Mac Donald G. The analyses of the sporozoite rate. *Trop Dis Bull*. 1952, 49(6):596-589.
- Meyer RP. Pathogen incubation and vector competence. *Bull. Soc. Vector. Ecol*. 1989; 14:60-66.
- Milby MM, Reisen WK. Estimation of Vectorial Capacity: Vector Survivorship. *Bull. Soc. Vectol Ecol*. 1989. 14(1): 47-54.
- Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson MC. Dispersal of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*. 1993 30:427-435.
- Moschin JC. Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) do Parque Estadual da Cantareira (PEC) e Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) região metropolitana de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

- Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural do sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 2006;40:6.
- Myskova J, Svobodova M, Stephen M. Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microb Infect*. 2007;9:317-324.
- Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. 2006. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:540-543.
- Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafronte RS, Andrade Jr HF. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004;46(6):335-338.
- Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Jr JT HF, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:87-94.
- Pessôa SB, Coutinho JO. Infecção natural de experimental dos flebótomos pela *Leishmania brasiliensis* no Estado de São Paulo. *Hospital*. 1941;20:25-35.
- Pessôa SB, Pestana BR. Sobre a disseminação da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. Resultados de um inquérito realizado nos “Centros de Saúde” do interior. *Folha Méd*. 1940;21:20-23.
- Pessôa SB, Barretto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Brasil. 1948.
- Pimenta PFP, Freitas VC, Secundino NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2012.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2005;99:905-913.
- Pita-Pereira D, Souza MB, Zuewtsch A., Alves CR, Britto C. & Rangel EF. Short communication: First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera:

- Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using multiplex polymerase chain reaction assay. *Amer J Med Hyg.* 2009;80:593-595.
- Queiróz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FCA, Souza RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Amer J Trop Med Hyg.* 1994;50:693-698.
- Rangel E, De Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80:219-226.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barboza AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79:395-396.
- Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger EF. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87:235-238.
- Reis RRR, Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevedo PCB, Moraes JLP, Santos MDC, Pereira SFR, Rebêlo JMM, Kuppinger O. Estudo Experimental da competência vetorial do flebotomíneo *Lutzomyia whitmani* originados de uma área endêmica de Leishmaniose tegumentar americana na região amazônica pelos parasitas *Leishmania amazonenses* e *Leishmania brasilienses*. 56 Congresso Brasileiro de Genética. 2010.
- Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: introduction. *Bull Soc Vector Ecol.* 1989;14:39-40.
- Rocha LSO, Santos CB, Falqueto A, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. *Parasitol Res.* 2010;107:465-468.
- Rogers ME, Bates PA. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens.* 2007;3:818-825.
- Ryan L, Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará state, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania*

- braziliensis* in the Serra dos Carajás. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1987;81:353-355.
- Sacks D; Kamhawi S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector- Host Interactions in Leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. 2001;55: 453-83.
- Santos MFC. Estudo da competência vectorial de *Lutzomyia almerioi* Galati & Nunes, 1999 para três espécies de *Leishmania*: *L. (Leishmania) infantum chagasi*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Campo Grande.[Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal; 2007.
- Savani ESM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. In a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Vet Parasit. 2009;160:18-24.
- Silva OS & Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:579-582.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology. 2010; 16: 1-21.
- SUCEN. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande São Paulo. Rev Saúde Pública. 2005;39:137-138.
- Tolezano, J. E. Ecoepidemiological Aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Men Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89: 427-434.
- Volf P, Myskova J. *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trend Parasit. 2007;23:91-92.
- WHO. Leishmaniasis. Burden of disease Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (acessado em 29/02/2012).

ANEXOS

ANEXO 1 – Autorização para atividades científicas - SISBIO

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 22399-1	Data da Emissão: 15/06/2010 10:10
Dados do titular	
Nome: Eunice Aparecida Bianchi Galati	CPF: 056.110.168-04
Título do Projeto: Estudo da capacidade vetorial de <i>Migonemyia migonei</i> (França) e de <i>Pintomyia fischeri</i> (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>Infantum</i> chagasi Cunha & Chagas e <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> Vianna	
Nome da Instituição: Faculdade de Saúde Pública, USP	CNPJ: 63.025.530/0017-71

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de febotomíneos em campo	02/2010	07/2011
2	criação de febotomíneos em laboratório	02/2010	12/2011
3	experimentos com infecção experimental de febotomíneos	04/2010	12/2011
4	experimentos com transmissão de leishmania para hamsters limpos	04/2010	12/2011
5	divulgação dos resultados	01/2012	06/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não extingue o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte: www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	O pesquisador estrangeiro FREDY GALVIS OVALLOS está dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia. Vinculada a programa de bolsa ou auxílio à pesquisa patrocinado pelo CNPq (Processo CNPq nº 190003/2010-3).

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Walter Ceretti Junior	Coletas de febotomíneos e infecção experimental dos insetos	053.655.728-40	12276290-3 SSP-SP	Brasileira
2	Ana Marina Corrêa Diniz Barboza Lino	Auxiliar na realização do xenodiagnóstico em cães.	889.904.517-87	373190529 SSP-TO	Brasileira
3	páscua aparecida bichlato	Auxiliar nas coletas de febotomíneos	077.314.458-79	8.773.881-8 SSP-SP	Brasileira
4	Mauro Toledo Marrelli	Infecção experimental e identificação de Leishmania	093.690.198-55	13163320-X SSP-SP	Brasileira
5	Rosely dos Santos Malafronte	Auxiliar na identificação da infecção nos hamsters	039.413.698-57	8.361.873-9 SSP/SP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 72986918

Página 1/3

ANEXO 2 - Declaração de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Declaração de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA ÉTICA
Av. Dr. César de Camargo Aguiar, 170
Cidade Universitária - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7000 e 3394-1137 FAX: (55-11) 3064-3120 e 3075-3174

São Paulo, 04 de novembro de 2009.

Ilmo (s)

Emilia Aparecida Bianchi Galati

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e aprovou, na due de respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número CEP-IMT 057/2009 e intitulado "Estudo da capacidade viral de *Mogamyma mogeni* (Finlay) e de *Pimomya fischeri* (Pinto) (Ordem: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Chagas) *Cunha & Chagas* e *Leishmania* (*Vianna*) *brasilensis* Vianna", sob a sua orientação.

Atenciosamente

Dr. Paulo Corran

Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT

Comissão de Ética
Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo

ANEXO 3 - Declaração de aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP/FSP
Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/14/10

5 de março de 2010.

Prezado(a) Pesquisador(a) e Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP/FSP, analisou, em sua 1.ª/10 Sessão Ordinária, realizada em 19/02/2010, de acordo com a Resolução n.º 193/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e suas complementações o ADENDO ao protocolo de pesquisa n.º 2036, intitulada "ESTUDO DA CAPACIDADE VETORIAL DE *Hiponemys nigroni* (França) E DE *Hemaphysalis fischeri* (Pinto) (Diptera: psychodidae) PARA *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas e *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna", área temática GRUPO III, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) Eunice Aparecida Bianchi Galati, considerando HOMOLOGADA e aprovada "AD-REFERENDUM".

Cabe lembrar que conforme Resolução acima mencionada são deveres do (a) pesquisador (a): 1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e qualquer modificação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa; 2. Manter até sua morte e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados de pesquisa, contendo listas individuais e todos os demais documentos mencionados pelo CEP, no caso eventual auditoria; 3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; 4. Deixar e apresentar cópias pessoais e Anal; 5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Carlos Lúcio

Professor Titular
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Para: Sr.ª

Prof.ª Dr.ª Eunice Aparecida Bianchi Galati
Departamento de Epidemiologia
Faculdade de Saúde Pública - USP

Av. Dr. Arnaldo, 715 - Associação Acadêmica CEP: 01246-904 - São Paulo - SP
Telefones: (55-11) 3061-7779 / 7742 e-mail: comet@usp.br site: <http://usp.br>

**ANEXO 4 - Declaração de aprovação do projeto pela
Comissão de Biossegurança da FSP/USP.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA
Av. Dr. Arnaldo, 715
CNP: 01246-904 São Paulo/SP Brasil

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Senhora Professora

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), em sua 2ª reunião Ordinária analisou, quanto aos aspectos de biossegurança, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da capacidade viral da *Adenovirus* engueta (Franga) e de *Parvovirus fischeri* (Pirarê) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) guyanensis* (Chagas & Chagas) e *Leishmania* (Vianna) *brasilensis* Vianna, sob a responsabilidade da Professora Associada Eunice Aparecida Bianchi Galati

A CIBio considerando a adequada infraestrutura instalada no laboratório de Flebotomíneos do Departamento de Epidemiologia desta unidade, a longa experiência do responsável pelo projeto em relação a metodologia que será empregada, e desde que regidas as boas práticas de laboratório, considera que a pesquisa pode ser realizada com baixo grau de risco para os setores envolvidos, decidindo, portanto, favoravelmente pela realização do estudo

Atenciosamente

Glória Regina Mami
Professor Associado
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
FSP-USP

Ilma Senhora
Eunice Aparecida Bianchi Galati
Professora Associada
FSP-USP

CURRÍCULO LATTES - Eunice Aparecida Bianchi Galati

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1359035734723864>
- Última atualização do currículo em 17/10/2012

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1977), graduação em Ciências pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1981) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1990). Atualmente é professor associado da Universidade de São Paulo. Tem experiência no ensino sobre Epidemiologia e Entomologia em Saúde Pública. Em pesquisa em Entomologia Médica, atuando principalmente nos seguintes temas: Phlebotominae, Psychodidae, leishmaniose tegumentar, taxonomia e epidemiologia. Atualmente desenvolve projeto sobre capacidade vetorial de Phlebotominae em relação às leishmânias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* chagasi. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Eunice Aparecida Bianchi Galati

Nome em citações bibliográficas

GALATI, E. A. B.; Galati, E.A.B.; Galati, Eunice A. B.

Sexo

Feminino

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia.

Av. Dr. Arnaldo, 715

Cerqueira Cesar

01246-904 - São Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30617786

Fax: (11) 30617926

Formação acadêmica/titulação

2008

Livre-docência.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2008.

Palavras-chave: cavernas; dispersão; Ecologia de vetores; Fauna flebotomínea; Leishmanioses; ambiente antrópico.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes / Especialidade: Entomologia Médica.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Ecologia / Subárea: Ecologia de Vetores.

Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.

1983 - 1990

Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas, Ano de obtenção: 1990.

Orientador: Ubirajara Ribeiro Martins de Souza.

Palavras-chave: Sistemática; Psychodidae; Taxonomia; Phlebotominae; Diptera.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes / Especialidade: Entomologia Médica.

Setores de atividade: Saúde Humana.

1979 - 1981

Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Aspectos taxonômicos e biogeográficos do gênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 e sua importância epidemiológica (Diptera, Phlebotominae), Ano de Obtenção: 1981.

Orientador: Oswaldo Paulo Forattini.

Palavras-chave: Taxonomia; Biogeografia; Diptera; Phlebotominae; Psychodopygus.

CURRÍCULO LATTES - Morgana Michele Cavalcanti de Souza Leal Diniz

Bolsista de Mestrado do CNPq

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3464376209407373>
- Última atualização do currículo em 21/11/2012

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba (2008). Mestrado em andamento pela Faculdade de Saúde Pública (USP). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Morgana Michele Cavalcanti de Souza Leal Diniz

Nome em citações bibliográficas

LEAL, M. M. C. S.

Sexo

Feminino

Endereço

Endereço Profissional

Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo- USP.
Avenida Dr. Arnaldo 715
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2011

Mestrado em andamento em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública/ USP.

Título: Estudo da capacidade vetorial de *Miconemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para

Leishmania (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, Orientador: Eunice Aparecida Bianchi Galati.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2005 - 2008

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil.

Título: Custo Adaptativo Associado a resistência de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado temefós.

Orientador: Eduardo Barbosa Beserra.

Bolsista do(a): Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil.

Vínculo institucional**2007 - 2008**

Vínculo: Bolsa, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.