**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Capacidade vetorial de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*)
cruzi (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum***

Everton Falcão de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof. Dr. Eunice Aparecida Bianchi Galati

**São Paulo
2015**

**Capacidade vetorial de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*)
cruzi (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum***

Everton Falcão de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof. Dr. Eunice Aparecida Bianchi Galati

**São Paulo
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

*Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar
a vida dos seres humanos.*

*A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.*

A capacidade de escolher novos rumos.

*Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão,
o trabalho; além do trabalho, a ação; e, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de
buscar no interior de si mesmo, a resposta e a força para encontrar a saída.*

Mahatma Ghandhi

Dedico esta tese à Elisa Teruya Oshiro, amiga, médica veterinária e, acima de tudo, o exemplo de profissional e ser humano. Serei eternamente grato pelo suporte técnico, científico e humano/emocional que me sustentaram ao longo desses últimos anos. Meu respeito, admiração e carinho por você crescem continuamente desde o momento em que nos conhecemos.

AGRADECIMENTOS

Mais um ciclo se encerra e um novo se inicia, ou se reescreve. A construção da minha trajetória acadêmica e profissional alinha-se com as de várias pessoas que, de algum modo, contribuíram com a minha formação. Desde muito novo já sabia que academia seria meu segundo lar.

Durante esta jornada, inúmeros foram os contratempos e as dificuldades inerentes ao trabalho de campo e experimental. No entanto, fui afortunado por contar com pessoas que sempre estiveram à disposição e proporcionaram a continuidade deste trabalho. Deste modo, agradeço primeiramente a Deus por tudo que conquistei até aqui, pelas lutas e pelo aprendizado adquirido em cada obstáculo superado. Agradeço também...

À minha família pelo apoio e incentivo dado. Serei eternamente grato por tudo que meus pais fizeram, não medindo esforços, para me proporcionar uma educação de qualidade. Esta, segundo eles, é herança mais preciosa que qualquer pai pode deixar ao seu filho. Agradecimentos especiais devem ser feitos a minha querida mãe, Maria de Fátima, e minha irmã, Laura Cristina, por todo amor, zelo, amizade, carinho, paciência e atenção.

À minha orientadora, professora Eunice Galati, por acreditar no meu potencial, aceitar-me como aluno e por depositar em mim a confiança de conduzir um trabalho desta magnitude praticamente à distância. Costumo dizer que uma das escolhas mais sabias que fiz nos últimos anos foi a mudança para São Paulo e o ingresso no curso de doutorado da Faculdade de Saúde Pública. Não tenho palavras para descrever o amadurecimento pessoal e profissional que adquiri durante este período.

A amiga, a quem dedico este trabalho, Elisa Teruya Oshiro, por tudo que vivenciamos juntos, especialmente nos três últimos anos. Muito obrigado por ser meu suporte técnico e científico, por sempre estar presente e disposta a me ajudar.

A professora Alessandra Gutierrez, por participar da concepção do projeto inicial e permitir o acesso a toda estrutura física que precisei para a execução deste trabalho. Muito obrigado pelo companheirismo e disposição durante o trabalho de campo. Agradeço ainda em seu nome, a Universidade Federal de Mato Grosso Sul, local onde tenho passado a maior parte do tempo desde 2005.

Ao Wagner Fernandes, companheiro de viagem que sempre esteve presente e me acudiu sempre que precisei. Ter companheiros de pesquisa como você e a Elisa é uma dívida que agradeço todos os dias.

À Paula Murat, amiga de longa data, que não mediu esforços, abriu mãos das poucas horas de descanso que tinha para me ajudar. Como dizíamos brincando (mas no fundo, era verdade), você foi essencial para a finalização deste trabalho. Muito obrigado por me acompanhar, me ensinar e me transmitir a segurança e confiança que necessitava para prosseguir.

Aos amigos irmãos Walter Lins, Lara Sandri, Priscilla Arashiro e Ana Carolina Nowak que mesmo distantes participaram ativamente de todo o processo, desde a seleção até a construção final desta tese, além de sempre me socorrerem e me apoiaram nos momentos que precisei.

À Gabriela e Carolina Lins, além de toda família Lins, que sempre me hospedaram e me acolheram, em todos os sentidos possíveis, em suas residências.

Ao meu tio Benedito Falcão e sua família por me acolherem e proporcionarem o conforto e liberdade suficientes para que me sentisse em casa, e de fato, eu estava.

Aos queridos colegas companheiros do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP/Phlebotominae), Morgana Diniz, Priscila Sábio, Cecília Lavitschka e ao Fredy Galvis, com quem também dividi apartamento, pela amizade e momentos de estudo e discussão.

À Marcio Medeiros, ex-monitor e hoje professor, pela revisão e auxílio nas análises estatísticas, meu muito obrigado pela paciência e prestatividade.

Às amigas Amanda Barbosa, Poliana Peres e Rafaela Dias, queridas companheiras de sala e engenheiras ambientais que me acompanharam durante minha aventura na segunda graduação, além de serem excelentes ouvintes e conselheiras. A sinceridade, espontaneidade e alegria contagiante de todas deram-me o conforto que precisei nos momentos certos. Agradeço também ao amigo Júlio Werk que também sempre esteve disposto a me ajudar, auxiliando-me os com desenhos técnicos. Enfim, sou muitíssimo grato a todos que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma com a execução e finalização deste trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Corumbá pelo apoio logístico para a instalação de armadilhas e pelo suporte que precisávamos em Corumbá. À Walkiria Arruda da Silva, chefe do CCZ de Corumbá, e às biólogas Neiva Monaco e Michelle

Ravanelli, pela grande colaboração e apoio técnico durante as atividades de campo. Também sou grato ao CCZ de Campo Grande e agradeço à Julia Macksoud Brazuna, chefe do CCZ, pela autorização para o uso de animais que estavam sob responsabilidade desse órgão. Também sou muito grato a todos os moradores que cederam suas residências e autorizaram a coleta de flebotomíneos, em especial o Seu Divino e toda sua família, com destaque para o jovem Robert que foi um fiel companheiro em todas as coletas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia, que considero minha segunda casa, pelo apoio e acolhimento durante os últimos anos. Em especial, à Aline Casaril e Nathália Mateus, que participaram diretamente deste trabalho.

Aos professores Roberto Gamarra e Antônio Paranhos Filho pela colaboração durante a concepção das análises ambientais dentro projeto de pesquisa e pela revisão crítica deste estudo, além do apoio físico e técnico fornecido durante essas análises.

À professora Alda Ferreira pela colaboração, paciência e suporte científico/técnico durante as análises moleculares e à Alda Isabel pela parceria inicial para o uso de cães com leishmaniose visceral.

Ao Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior por sempre me atender quando precisei e pelos empréstimos de materiais que foram essenciais na fase final das análises moleculares. Não poderia esquecer da querida Rosianne Tsujisaki que pacientemente me auxiliou em alguns momentos no Laboratório de Biologia Molecular da UFMS.

Ainda agradeço aos professores membros da banca avaliadora desta tese por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições (Dr. Delsio Natal, Dr. Cláudio Casanova, Dr. Fernando Ferreira, Dra. Marcia Dalastra, Dr. Mauro Toledo e Dr.a Vânia Nunes).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (PROCESSO FAPESP 2011/23414-0) pela concessão da bolsa que possibilitou minha permanência em SP e pela reserva técnica que financiou grande parte do trabalho de campo que foi realizado, além de proporcionar a condução da parte laboratorial.

Por fim, agradeço à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Atribuo uma parte expressiva da minha formação acadêmica a esta faculdade e ao seu corpo docente, em especial do Departamento de Epidemiologia.

OLIVEIRA, E. F. **Capacidade vetorial de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum***. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2015.

RESUMO

Em algumas regiões, como nos municípios de Corumbá e Ladário, no Estado de Mato Grosso do Sul, existem evidências ecológicas e epidemiológicas de que *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938) seja a principal responsável pela transmissão do protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 (ou subespécie de *L. (L.) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 segundo alguns autores), agente etiológico da leishmaniose visceral (LV). A ausência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), principal vetor do parasito, reforçam esta hipótese. Este estudo teve por objetivo avaliar os parâmetros e estimar a capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972. Para este último, apenas foram avaliados os parâmetros, sem a estimativa numérica da capacidade vetorial. A avaliação da capacidade vetorial foi realizada a partir de experimentos laboratoriais (infecção experimental) e de campo (atratividade aos flebotomíneos). Por intermédio da infecção experimental de *Lu. cruzi* pelo parasito, foi possível estimar a expectativa de sobrevida diária de fêmeas infectadas (estimativa vertical e laboratorial), avaliar o período de incubação extrínseco do parasita e obter duração do ciclo gonotrófico. Para a avaliação da competência vetorial do inseto, foram realizadas tentativas de transmissão experimental e natural de *Leishmania*, a partir de fêmeas provenientes de colônia cujos indivíduos foram alimentados durante o xenodiagnóstico e de fêmeas selvagens capturadas em campo, respectivamente. A distribuição sazonal de *Lu. cruzi* foi avaliada por meio da instalação semanal de armadilhas luminosas no peridomicílio de cinco residências na área urbana do Município de Corumbá. Variáveis meteorológicas obtidas junto ao Centro de Monitoramento do Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul, índices radiométricos calculado a partir de imagens de resolução espacial (GeoEye) e o percentual de cobertura vegetal foram utilizados neste estudo. Os resultados obtidos permitiram estimar a capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum*, que foi de 0,24, ou seja, espera-se que a população de fêmeas da área produzam 0,24 novas infecções

por dia de exposição de uma infecção. A competência vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, via picada, foi demonstrada por meio de transmissão natural e experimental dos parasitos, respectivamente. Também foi identificada a infecção natural de *Lu. cruzi* por *L. (L.) amazonensis*. Com relação à distribuição mensal, embora não tenha sido observada a presença de associação entre essas espécies e as variáveis ambientais de vegetação e clima, foi possível observar picos elevados populacionais na estação chuvosa e picos menores na estação seca. O padrão da distribuição sazonal das espécies de flebotomíneos demonstrado neste estudo foi determinado basicamente pelos espécimes de *Lu. cruzi* capturados, uma vez que eles representam 93,94%. A variação mensal demonstrou que a espécie *Lu. cruzi* tem grande plasticidade, tendo sido observada em todos os meses de coleta.

Palavras-chave: capacidade vetorial, competência vetorial, *Lutzomyia cruzi*, leishmaniose visceral, flebotomíneos, epidemiologia.

OLIVEIRA, E. F. **Vectorial capacity of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) for *Leishmania (Leishmania) infantum***. [Doctoral Thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2015.

ABSTRACT

In some regions such as in the municipalities of Corumbá and Ladário in Mato Grosso do Sul state, there are ecological and epidemiological evidence that *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938) is the vector of *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 (or subspecies of *L. (L.) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 according to some authors), the etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL). The absence of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), the main vector of the parasite, supports this hypothesis. This study aimed to evaluate the parameters and estimate the vectorial capacity of *Lu. cruzi* for *L. (L.) infantum* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972. For the latter, only parameters was evaluated without numerical estimation of the vectorial capacity. The evaluation of the vectorial capacity was carried out from laboratory experiments (experimental infection) and field (attractiveness to sandflies). Through experimental infection by the parasite, it was possible to estimate the expected daily survival of infected females (vertical and laboratory estimate), evaluate the extrinsic incubation period of the parasite and get the length of gonotrophic cycle. To evaluate the insect vector competence, attempts have been made of experimental and natural transmission of *Leishmania* from females from colony whose subjects were fed for xenodiagnosis and wild females captured in the field, respectively. Monthly and seasonal distribution of *Lu. cruzi* was evaluated by weekly installation of light traps in the peridomicile of five residences in the urban area of the Municipality of Corumbá. Meteorological variables obtained from the Weather Monitoring Center, Climate and Water of Mato Grosso do Sul Resources, radiometric indices calculated from spatial resolution images (GeoEye) and the percentage of plant cobertural were used in this study. Results allowed estimating the vectorial capacity of *Lu. cruzi* for *L. (L.) infantum*, which was 0.24, i.e., it is expected that the female population in the region produce 0.24 new infections per day of exposure to an infection. Vector competence of *Lu. cruzi* for *L. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* by biting, was demonstrated by natural and experimental transmission of both parasites, respectively. Natural infection of *Lu. cruzi* by *L. (L.) amazonensis* was identified. Regarding the monthly

distribution, there was no significant association between of sandflies and the environmental and climate variables. It was observed high peaks population in the rainy season and lower peaks in the dry season. The pattern of seasonal distribution of species of sand flies demonstrated in this study was determined primarily by *Lu. cruzi* specimens, since this species represent 93.94% of the total captured. The monthly change showed that *Lu. cruzi* species has great plasticity and has been observed in all months of collection.

Keywords: vectorial capacity, vector competence, *Lutzomyia cruzi*, visceral leishmaniasis, sandflies, epidemiology.

SÚMARIO

APRESENTAÇÃO	19
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 LEISHMANIOSES: ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS.....	21
1.1.1 Leishmaniose visceral.....	21
1.1.2 Leishmaniose tegumentar.....	22
1.1.3 Leishmanioses em Mato Grosso do Sul	24
1.2 ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE <i>Leishmania</i> spp.	26
1.2.1 <i>Leishmania (Leshmania) infantum</i>	29
1.2.2 <i>Leishmania (Leshmania) amazonensis</i>	32
1.3 FLEBOTOMÍNEOS	33
1.4 INTERAÇÃO <i>Leshmania (Leishmania)</i> spp. E FLEBOTOMÍNEOS	35
1.4.1 Capacidade vetorial	39
1.5 DADOS AMBIENTAIS.....	41
1.6 JUSTIFICATIVA.....	43
2 OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA	46
3.2 EXPERIMENTOS DE CAMPO.....	47
3.2.1 Capturas de <i>Lutzomyia cruzi</i> para cultivo em laboratório	47
3.2.2 Distribuição sazonal.....	47
3.2.3 Atratividade humana e canina aos flebotomíneos	48
3.3 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS.....	50
3.3.1 Estabelecimento de colônia.....	50
3.3.2 Infecção experimental com <i>Leishmania</i>	50
3.3.3 Taxa de infecção experimental e período de incubação extrínseco	53
3.3.4 Sobrevida.....	53
3.3.5 Capacidade vetorial	54
3.3.6 Infecção natural por <i>Leishmania</i> spp.	55
3.3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)	56

3.3.8 Competência vetorial	57
3.3.9 Isolamento do parasito e análise molecular	58
3.4 DADOS AMBIENTAIS.....	58
3.4.1 Índices de cobertura vegetal e área de superfície impermeável.....	58
3.4.2 Variáveis meteorológicas.....	61
3.4.3 Análise estatística	61
3.7 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
4.1 ARTIGO 1: Alternative method for the mass rearing of <i>Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi</i> (Diptera: Psychodidae) in a laboratory setting	63
4.2 ARTIGO 2: Infecção experimental de <i>Lutzomyia cruzi</i> (Diptera: Psychodidae) por <i>Leishmania</i>: estimativa e parâmetros da capacidade vetorial	78
4.3 ARTIGO 3: Infecção natural de <i>Lutzomyia cruzi</i> (Diptera: Psychodidae) por <i>Leishmania</i> em área endêmica para leishmaniose visceral, Corumbá, região urbana do Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil.....	115
4.4 ARTIGO 4: Transmissão experimental e natural de <i>Leishmania</i> spp. via picada de <i>Lutzomyia cruzi</i> (Diptera: Psychodidae) para hamster	132
4.5 ARTIGO 5: Distribuição mensal, fatores ambientais bióticos e abióticos relacionados à abundância de flebotomíneos em área urbana endêmica para leishmaniose visceral, Corumbá, Brasil	147
5 CONCLUSÕES	177
REFERÊNCIAS.....	179
ANEXO A.....	199
CURRÍCULO LATTES.....	200

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Number of females captured, eggs, adults emerged and minimum life cycle according to rearing method.....	76
Table 2. Number of females followed for oviposition, minimum duration of life cycle and number of emerged adults using Method 2 according to rearing temperature ..	76
Table 3. Chemical analysis of macronutrients and micronutrients in soil used in Method 2	77

ARTIGO 2

Tabela 1 – Fêmeas de <i>Lutzomyia cruzi</i> alimentadas durante o xenodiagnóstico, segundo hospedeiro e espécie de <i>Leishmania</i>	106
Tabela 2 – Número de fêmeas de <i>Lutzomyia cruzi</i> alimentadas, dissecadas, infectadas e potencialmente infectadas, segundo hospedeiro e espécie de <i>Leishmania</i>	107
Tabela 3 – Medidas descritivas (em dias) obtidas pelo estimador Kaplan-Meier segundo hospedeiros e espécie de <i>Leishmania</i>	108
Tabela 4 – A atratividade dos hospedeiros aos flebotomíneos de acordo com as diferentes metodologias empregadas	108

ARTIGO 3

Tabela 1 – Distribuição de fêmeas utilizadas para pesquisa de infecção natural por <i>Leishmania</i> , segundo espécie e forma de análise	131
--	-----

ARTIGO 4

Tabela 1 – Transmissão experimental e natural de <i>Leishmania (L.) infantum</i> e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> para hamsters, via picada de flebotomíneos	145
---	-----

ARTIGO 5

Tabela 1 – Frequência absoluta de flebotomíneos, segundo sexo e local de coleta (bairros), Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.....	169
Tabela 2 – Medidas descritivas para o total de flebotomíneos e para <i>Ev. corumbaensis</i> , <i>Lu. cruzi</i> e <i>Lu. forattinii</i> segundo local de coleta (bairros), Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.....	170
Tabela 3 – Medidas descritivas para as variáveis meteorológicas, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014	174
Tabela 4 – Cobertura vegetal, índices de vegetação e umidade e área de superfície impermeável, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Área de estudo: localização geográfica do Município de Corumbá.....	46
Figura 2 – Distribuição espacial dos pontos de coleta semanais para a avaliação da distribuição mensal de flebotomíneos, Corumbá, MS, abril/2012 a março/2014..	48
Figura 3 – Barraca utilizada nos experimentos de atratividade humana e canina....	49
Figura 4 – Gaiola de náilon utilizada para o xenodiagnóstico em cães	52
Figura 5 – Etapas de para o cálculo do NDVI a partir da correção atmosférica da imagem multiespectral (software PCI Geomatica)	59

ARTIGO 1

Fig. 1. Flask for oviposition and cultivate of larvae and pupae. (a and b) Side view of flask and mesh lid, respectively. (c and d) Top view of the flask and mesh lid, respectively	77
---	----

ARTIGO 2

Figura 1 – Área de estudo, Corumbá, Mato Grosso do Sul.....	109
Figura 2 – Gaiola de náilon utilizada para o xenodiagnóstico em cães	110
Figura 3 – Barraca utilizada para experimentos de atratividade humana e canina aos flebotomíneos	111
Figura 4 – Promastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i> corada a partir do conteúdo residual presente em lâmina após dissecação de fêmea infectada	112
Figura 5 – Digestão de produtos amplificados da região ITS1 de <i>Leishmania</i> com a enzima de restrição <i>HaeIII</i>	113
Figura 6 – Estimativas de sobrevida pelo estimador Kaplan-Meier para os grupos de fêmeas alimentadas, não alimentadas, infectadas e não infectadas das coortes expostas aos cães (A) e aos hamsters (B).....	114

ARTIGO 3

Figura 1 – Digestão de produtos amplificados da região ITS1 de <i>Leishmania</i> com a enzima de restrição <i>HaeIII</i>	131
---	-----

ARTIGO 4

Figura 1 – Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (A) e de *Leishmania (L.) infantum* (B) visualizadas a partir de imprint de baço dos animais infectados via picada de *Lu. cruzi* 146

ARTIGO 5

Figura 1 – Distribuição espacial dos pontos de coleta semanais para a avaliação da distribuição mensal de flebotomíneos, Corumbá, MS, abril/2012 a mar/2014.... 166

Figura 2 – Distribuição mensal de *Lu. cruzi*, *Lu. forattinii* e *Ev corumbaensis*, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014 167

Figura 3 – Distribuição mensal de *Lu. cruzi* e das variáveis meteorológicas avaliadas, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014 168

LISTA DE ABREVIações

μL	Microlitro
<i>Br.</i>	<i>Brumptomyia</i>
cm	Centímetro
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>Ev.</i>	<i>Evandromyia</i>
h	Hora
hab.	Habitantes
<i>hsp70</i>	Proteína de choque térmico 70 kDa
ISA	Área de superfície impermeável
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
kDNA	DNA do cinetoplasto
km^2	Quilômetro quadrado
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose visceral
m	Metro
<i>Mi.</i>	<i>Micropygomyia</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
<i>Mt.</i>	<i>Martinsmyia</i>
NDVI	Índice de vegetação por diferença normalizada
NDWI	Índice de umidade por diferença normalizada
NNN	Neal, Novy, Nicolle
<i>Ny.</i>	<i>Nyssomyia</i>
<i>Pa.</i>	<i>Psathyromyia</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pi.</i>	<i>Pintomyia</i>

RFLP	Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição
rpm	Rotações por minuto
Sc.	<i>Sciopemyia</i>
seg	Segundo
SSU rDNA	<i>Small subunit Ribossomal</i> RNA
V.	<i>Viannia</i>
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
WHO	World Health Organization

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho aborda aspectos que estão diretamente e indiretamente relacionados à capacidade vetorial de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938) para *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 [sinônimo *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)]. O estudo foi conduzido nos municípios de Corumbá (experimentos de campo) e Campo Grande (experimentos laboratoriais), Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, durante abril de 2012 a fevereiro de 2015.

Os resultados apresentados foram estruturados no formato de artigos e compõem o capítulo “Resultados e Discussões” desta tese. O primeiro artigo, intitulado “Alternative method for the mass rearing of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) in a laboratory setting” descreve os métodos, tradicional e adaptado, empregados para o estabelecimento de colônia de *Lu. cruzi*. O tempo médio de desenvolvimento das formas imaturas do inseto é brevemente discutido. Este manuscrito foi submetido ao periódico *Journal of Medical Entomology* e encontra-se em fase de revisão.

O segundo artigo engloba todos os parâmetros envolvidos na estimativa numérica da capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum*, tais como a taxa de infecção experimental, a taxa de alimentação sanguínea durante o xenodiagnóstico, o período de incubação extrínseco do parasito, a duração do primeiro ciclo gonotrófico, a sobrevivência e a expectativa de vida de fêmeas infectadas. Ainda são apresentados dados referentes à infecção experimental de *Lu. cruzi* por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972.

O terceiro artigo aborda a infecção natural de flebotomíneos selvagens (capturados no campo de abril de 2012 a março de 2014) por *Leishmania*. O quarto manuscrito descreve a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* por meio da transmissão natural e experimental, respectivamente, dos parasitos para hamsters.

Por fim, o último artigo apresenta a distribuição mensal e sazonal de flebotomíneos capturados em Corumbá durante dois anos, além de verificar a presença de associações entre a abundância de insetos e algumas variáveis ambientais bióticas e abióticas. Com exceção do primeiro artigo, já submetido, os

demais serão submetidos à publicação após a realização banca de defesa desta tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES: ASPECTOS ECOEPIDEMIOLÓGICOS

As leishmanioses representam um complexo de doenças com variado espectro clínico e diversidade epidemiológica, configurando-se como um crescente agravo de saúde pública, não somente no Brasil, onde são consideradas endêmicas, mas em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010, 2014), essas protozooses estão entre as seis mais importantes doenças tropicais no mundo, sendo reportadas em 98 países e territórios, com aproximadamente 12 milhões de casos humanos. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas à infecção (COSTA, 2005; WHO, 2010, 2014).

Este cenário, com evidência da elevada e crescente incidência das leishmanioses, pode ser justificado pelas mudanças ambientais, resultantes das atividades humanas, que vêm modificando o perfil epidemiológico tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, como em focos enzoóticos naturais e em áreas onde a transmissão é periurbana envolvendo reservatórios domésticos (DEANE e GRIMALDI, 1985; SHAW, 2002).

1.1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), enfermidade infecciosa sistêmica crônica, tem sido assinalada em aproximadamente 65 países e estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos são registrados anualmente, sendo que 90% desses estão concentrados em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Brasil (ALVAR et al., 2012; DESJEUX, 2004; WHO, 2010, 2014).

Nas Américas, o agente etiológico da forma visceral é a *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, mas SHAW (2002) a classifica como a subespécie: *L. (L.) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937). No Brasil, a LV apresenta ampla distribuição geográfica e representa um sério problema de saúde pública, com registro de notificações em todas as regiões do país (WERNECK, 2010). Além da expansão territorial, o aumento da média anual casos notificados de 3.156 (até 2006) para 3.730 (2007-2013) também deve ser considerado (BRASIL, 2006a;

BRASIL, 2015a). Em 2013, foram notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Brasil 3.470 novos casos da doença (BRASIL, 2015a).

A apresentação clínica varia de formas assintomáticas até o quadro clássico da LV, caracterizado por febre alta, emagrecimento acompanhado de anemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e leucopenia. A debilidade progressiva e outras manifestações clínicas (diarréia, epistaxe, icterícia, vômito e edema periférico) podem ser observadas com a cronicidade da doença (DEANE e GRIMALDI, 1985; LAINSON e SHAW, 2005; MURRAY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

O ciclo de transmissão, que primariamente ocorria no ambiente silvestre e rural, passou a se desenvolver em centros urbanos, evidenciando o processo de expansão e urbanização desta enfermidade (GONTIJO; MELO, 2004). Na modalidade silvestre estão envolvidos, além do vetor *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), reservatórios que habitam habitats ecológicos pouco visitados pelo homem, ocorrendo com maior frequência na floresta amazônica ou no sertão nordestino (COSTA et al., 1990; COSTA, 2005). Na transmissão doméstica ou peridoméstica, o ciclo epidemiológico geralmente ocorre no ambiente rural ou periurbano, envolvendo o homem, o cão doméstico e o inseto vetor (DEANE; DEANE, 1962).

1.1.2 Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) tem sido notificada em 88 países, distribuídos em quatro continentes (América, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (GONZÁLEZ et al., 2009; WHO, 2014). Devem-se considerar, também, os casos não notificados e os não diagnosticados.

No Brasil, a LT encontra-se amplamente distribuída, sendo notificada em todos os estados brasileiros. A partir da década de 80, verificou-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995) com picos de transmissão a cada cinco anos (BRASIL, 2010, 2006b). Em 2013 ocorreram 19.652 novas notificações de LT no Brasil (BRASIL, 2015b). Nos últimos anos, as regiões Norte e Centro-Oeste têm sido responsáveis pelos maiores coeficientes de detecção, especialmente nos estados de Mato Grosso, Amapá, Rondônia, Acre,

Pará, Amazonas, Tocantins e Roraima, além do Maranhão e Bahia, na Região Nordeste (BRASIL, 2010, 2015b; VALE; FURTADO, 2005).

Cerca de 10 espécies são responsáveis pela infecção cuja doença resulta nas formas clínicas dermatrópicas. No Brasil, estas compreendem sete: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, de ocorrência na região amazônica, Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país; *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954; *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987; *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Povia & Ishikawa, 1989 e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, De Souza & Lainson, 2002. As últimas cinco espécies são encontradas na região amazônica e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916, encontra-se amplamente distribuída pelo Brasil (DORVAL et al., 2006; SHAW, 2002; SILVEIRA et al., 2002).

Classicamente, a doença é classificada em duas formas: cutânea e mucosa, também conhecida como mucocutânea. O espectro clínico é polimórfico, atingindo pele e mucosas, e caracterizado pela presença de lesões ulcerosas indolores, únicas e de duração limitada (forma cutânea localizada), lesões papulares (forma cutânea disseminada), lesões nodulares não ulceradas (forma cutânea difusa) ou mucocutâneas que afetam a mucosa nasofaríngea após infecção cutânea inicial (forma mucocutânea) (BRASIL, 2010; LAINSON e SHAW, 2005; MURRAY et al., 2005).

A modalidade clássica de transmissão da LT é a silvestre, na qual o homem adquire a infecção ao adentrar o foco natural da parasitose, onde interagem seus reservatórios naturais e vetores (PESSOA; BARRETTO, 1948; RANGEL; LAINSON, 2003; SHAW; LAINSON, 1987). Nesta circunstância, a doença atinge predominantemente o sexo masculino na faixa etária produtiva. Manifesta-se de forma endêmica em quase todos os estados brasileiros e, ocasionalmente, ocorre na forma de surtos epidêmicos (GOMES, 1992; JONES et al., 1987; NEGRÃO e FERREIRA, 2014; VALE; FURTADO, 2005). No entanto, em regiões do país com maior impacto de ações antrópicas, sobretudo no Sudeste e no Nordeste, o parasito *L. (V.) braziliensis* encontra-se adaptado a ecossistemas alterados e a sua transmissão vem ocorrendo em áreas urbanas (GOMES, 1992; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). NEGRÃO e FERREIRA (2014) sugerem que a expansão geográfica da doença tem ocorrido em decorrência dos movimentos

migratórios associados a diferentes processos de ocupação espacial, observados em escalas temporais e regionais, que modificaram a ecoepidemiologia da parasitose em várias regiões do Brasil.

1.1.3 Leishmanioses em Mato Grosso do Sul

A LV tem sua ocorrência registrada em Mato Grosso do Sul desde 1911, com casos esporádicos até a década de 80. Acredita-se que o primeiro caso humano autóctone dessa parasitose, com comprovação parasitológica, no Continente Americano tenha sido registrado na região de Porto Esperança, Município de Corumbá (DEANE, 1956; MIGONE, 1913). Na década de 40, foram registrados dois casos humanos, um em uma criança residente no Município de Rio Brilhante e o outro em um adulto que na época trabalhava na ferrovia Bolívia-Brasil, também em Corumbá (ARRUDA et al., 1949).

A partir de 1980, neste município, iniciou-se a notificação dos primeiros casos humanos de LV. Este fato, aliado à ocorrência de cães com aspectos sugestivos da doença, estimulou estudos na área com o intuito de esclarecer componentes epidemiológicos importantes da parasitose na região. Na ocasião, a infecção canina já estava disseminada e foi diagnosticada em 8,7% de 481 cães examinados. O parasito isolado foi *L. (L.) infantum* (NUNES et al., 1988). Na ocasião, a fauna flebotomínea era composta por oito espécies, com predomínio de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira 1938), seguida de *Lutzomyia (Lutzomyia) forattinii* Galati, Rego Jr., Nunes & Oshiro, 1985 e *Evandromyia corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989). Todas as espécies foram capturadas nas áreas peri e intradomiciliar, demonstrando, as duas primeiras, elevada antropofilia e alta densidade populacional. Com base neste cenário, foi sugerido que essas espécies pudessem participar da transmissão do parasito em Corumbá (GALATI et al., 1985; 1997). Posteriormente, SANTOS et al. (1998) encontraram *Lu. cruzi* naturalmente infectada e a incriminaram como espécie vetora do agente da leishmaniose visceral na cidade.

A doença permaneceu restrita a esta área até 1995 e a partir de então, iniciou lentamente a sua expansão para municípios adjacentes. No ano de 1999, foram notificados 61 casos de LV, com nove óbitos e 54% das notificações em crianças menores de 10 anos. Nesse período a LV abrangia 11 municípios, dentre os quais,

Aquidauana e Anastácio, distantes 270 km de Corumbá (CORTADA et al., 2004; MATO GROSSO DO SUL, 2006).

A parasitose continuou seu processo de expansão e urbanização, atingindo, nos anos subsequentes, 58 dos 78 municípios de Mato Grosso do Sul até dezembro de 2014 (MATO GROSSO DO SUL, 2015). Ressalta-se a ocorrência de uma epizootia canina, com diagnóstico conclusivo de casos autóctones de LV em cães na cidade de Campo Grande em 1999 (SILVA et al., 2000) e o caráter epidêmico da doença na cidade de Três Lagoas, município vizinho ao Estado de São Paulo em 2000 (OLIVEIRA ALL et al., 2006).

Em Campo Grande, OLIVEIRA et al. (2003) assinalaram pela primeira a presença de *Lu. longipalpis*, espécie comprovadamente vetora de *L. (L.) infantum*, na área urbana da cidade no ano de 1999, chamando a atenção para a ocorrência em simpatria com *Lu. cruzi*, espécie apontada como vetora do protozoário em Corumbá e Ladário (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998) e também em Jaciará, Estado de Mato Grosso (BRITO et al., 2014; MISSAWA et al., 2006, 2011).

Atualmente, a LV mantém-se em expansão geográfica acometendo populações rurais e urbanas, indivíduos jovens e adultos, em qualquer faixa etária (BOTELHO e NATAL, 2009; OLIVEIRA ALL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010). De 1999 até dezembro de 2014 foram registrados no Estado 3.245 casos humanos da doença. Destes, 115 foram notificados em Corumbá, correspondendo a 3,54% do total confirmado para o Estado no mesmo período (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Quanto a LT, a parasitose é endêmica com ampla distribuição e crescente número de casos. Pouco se conhece a respeito de várias características clínicas, biológicas e epidemiológicas da doença no Estado. Apesar da existência dos trabalhos de NUNES et al. (1995) e de DORVAL et al. (2006) que identificaram *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, desconhece-se a real etiologia dos casos da doença em Mato Grosso do Sul.

De 1983 a 2014, foram confirmados 6.812 casos da doença, distribuídos em praticamente todos os seus 78 municípios, devendo-se, portanto, reconhecer a importância dessa parasitose no Estado (BRASIL, 2007; MATO GROSSO DO SUL, 2015). A elevada prevalência da doença é justificada por ser uma região com altitude, clima e vegetação favoráveis à ocorrência de vetores e reservatórios, além de se verificar constante abertura de novas estradas, intenso fluxo migratório,

implantação de projetos agropecuários e de assentamentos de trabalhadores rurais sem terra (DORVAL et al., 2006).

A doença predomina no sexo masculino, na faixa etária acima de 15 anos, em indivíduos procedentes de área rural, sugerindo que o perfil epidemiológico da LT no Estado é de transmissão silvestre, no qual o homem adquire o parasito quando adentra o foco natural da parasitose onde interagem seus reservatórios naturais e vetores (NOGUCHI, 2001; NUNES et al., 1995, 2001).

1.2 ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE *Leishmania* spp.

As espécies do gênero *Leishmania* Ross, 1903 são organismos unicelulares caracterizados pela presença de flagelo e de uma organela rica em DNA, o cinetoplasto. As formas evolutivas flageladas (promastigotas) são encontradas no hospedeiro invertebrado e as formas imóveis (amastigotas) no hospedeiro vertebrado. Neste último, comportando-se como parasito intracelular obrigatório (LAINSON e SHAW, 1987, 2005; SHAW, 2002).

As classificações iniciais propostas para os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* baseavam-se em critérios biológicos e ecológicos, como o ciclo de desenvolvimento no inseto vetor (hospedeiro invertebrado), distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas (LAINSON e SHAW, 1979, 1987; PRATT E DAVID, 1981).

Em 1979, LAINSON e SHAW (1979) propuseram a classificação básica das espécies de *Leishmania* determinada pelo padrão do ciclo de vida e desenvolvimento nos flebotomíneos, agrupando-as em três seções: i) Hypopylaria: que engloba as espécies mais primitivas, encontradas apenas em lagartos do Velho Mundo, cujo desenvolvimento é restrito ao intestino posterior do flebotomíneo vetor e a transmissão ocorre quando o inseto infectado é ingerido pelo lagarto; ii) Peripylaria: que abriga as espécies que se desenvolvem obrigatoriamente no intestino posterior do flebotomíneo, porém também ocorre a migração para os intestinos médio e anterior, sendo a transmissão mediada pela picada do flebotomíneo infectado; e iii) Suprapylaria: neste grupo o desenvolvimento das formas evolutivas do parasito ocorre somente nas porções média e anterior do intestino do hospedeiro invertebrado e a transmissão também se dá por via inoculativa.

A seção suprapylaria foi ainda dividida em quatro complexos: i) Complexo *L. donovani* que incluía *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903 (Velho Mundo); *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Velho Mundo); *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (Novo Mundo); ii) Complexo *L. mexicana* que incluía *L. mexicana mexicana* (Biagi, 1953) Lainson & Shaw, 1979; *L. mexicana amazonensis* Lainson & Shaw, 1972; *L. mexicana pifanoi* (Medina & Romero 1959) Medina & Romero, 1962; *L. mexicana aristidesi* Lainson & Shaw, 1979; *L. mexicana enriettii* Muniz & Medina, 1948 (todas as espécies pertencem ao Novo Mundo); iii) Complexo *L. hertigi* que incluía *L. hertigi hertigi* Herrer, 1971; *L. hertigi deanei* Lainson & Shaw, 1977 (Novo Mundo); e iv) Complexo *L. tropica* que incluía *Leishmania tropica* (Wright, 1903) Lühe, 1906; *Leishmania major* Yakimov & Schockov, 1914; *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford & Bray, 1973 (todas as espécies pertencem ao Velho Mundo).

Diferenças na distribuição geográfica e a análise do perfil de isoenzimas (MILES et al., 1980), além do desenvolvimento das formas evolutivas de *Leishmania* no inseto vetor, induziram LAINSON e SHAW (1987) a revisarem a antiga classificação, subdividindo o gênero *Leshmania* em dois subgêneros: *Leishmania* Ross, 1903 e *Viannia* Lainson & Shaw, 1987. De acordo com COX (2005) e LAINSON e SHAW (2005), a classificação atualmente aceita das espécies neotropicais de *Leishmania* é a apresentada abaixo:

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818
 Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1998
 Classe: Kinetoplastea: Honigberg, 1963
 Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880
 Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901
 Gênero: *Leishmania* Ross, 1903
 Subgênero: *Leishmania* Ross, 1903
 Subgênero: *Viannia* Lainson & Shaw, 1987

As espécies do subgênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida no inseto hospedeiro limitando-se ao intestino médio e anterior. Ocorrem tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo. A espécie tipo é *Leishmania (Leishmania) donovani*. As espécies neotropicais conhecidas são: *Leishmania (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937; *L. (L.) enriettii* Muniz & Medina, 1948; *L. (L.) mexicana* (Biagi, 1953) Garnham, 1962; *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972; *L. (L.) aristidesi* Lainson & Shaw,

1979; *L. (L.) venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980; *L. (L.) garnhami* Scorza et al, 1979; *L. (L.) pifanoi* (Medina & Romero, 1959) Medina & Romero, 1962; *L. (L.) hertigi* Herrer, 1971; *L. (L.) deanei* Lainson & Shaw, 1977 (LAINSON, 2010; LAINSON e SHAW, 1987, 2005).

O subgênero *Viannia* engloba espécies cujo ciclo de vida no flebotomíneo ocorre na porção posterior do trato alimentar e é representado por uma fase de proliferação com formas paramastigotas arredondadas e ovoides, bem como algumas formas promastigotas aderidas à parede do intestino posterior (píloro e/ou íleo) por meio de hemidesmossomos flagelares. No entanto, ocorre uma migração dos parasitas para os intestinos médio e anterior. A espécie-tipo é *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916. Somente espécies neotropicais são conhecidas para este subgênero: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) peruviana* Velez, 1913; *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954 e *L. (V.) panamensis* Lainson & Shaw, 1972.

A origem, evolução e dispersão destes protozoários ainda não foram completamente elucidadas. Dados referentes à biogeografia histórica, incluindo registros fósseis, à ecologia e filogenia dos organismos envolvidos devem ser considerados e testados contra dados independentes durante a construção de possíveis cenários e hipóteses para explicar a origem do parasito (NOYES et al., 2000).

Duas hipóteses têm sido propostas para a evolução do gênero *Leishmania* envolvendo a origem Neotropical (NOYES, 1998; NOYES et al., 2000) e Paleártica (KERR, 2000). NOYES (1998) considerou a origem Neotropical para o gênero sustentando-se em análises de sequências filogenéticas. Com base em dados bioquímicos, moleculares, biogeográficos, entomológicos e ecológicos, KERR (2000) propôs uma origem Paleártica no início da Era Cenozóica, seguida pela dispersão ao Neártico no final do Eoceno e à região Neotropical durante o Plioceno, após a formação da ponte de terra panamenha há cerca de três milhões de anos. Outra hipótese sustenta a origem Neotropical para o subgênero *Viannia*, enquanto uma origem Africana é proposta para *L. (Leishmania)*, como resultado de várias introduções de parasitas do gênero *Leishmania* no Novo Mundo (MOMEN e CUPOLILLO, 2000).

As relações filogenéticas entre as espécies de *Leishmania* têm sido estudadas por meio de diferenças na história natural de seus hospedeiros vertebrados, especificidade do vetor, manifestações clínicas, distribuição geográfica

(LUKES et al., 2007) e pelo uso de abordagens moleculares com diferentes marcadores (BOITE et al., 2012; FRAGA et al., 2010; MAURICIO et al., 2004; MOTOIE et al., 2013). No entanto, as relações evolutivas continuam pouco esclarecidas, uma vez que muitos estudos incluem apenas as espécies do Novo ou do Velho Mundo, ou isolados e cepas de regiões geográficas específicas (MARCILI et al., 2014; HUGHES e PIONTKIVSKA, 2003; TUON et al., 2008).

1.2.1 *Leishmania (Leishmania) infantum*

Em 1937, o agente etiológico da leishmaniose visceral americana foi caracterizado com uma espécie distinta e nomeado como *Leishmania (L.) chagasi* por CUNHA e CHAGAS (1937) mediante a sua incapacidade de produzir, experimentalmente, a doença clínica sintomática no cão doméstico; diferindo de *L. (L.) infantum*, agente causal da leishmaniose visceral na Bacia do Mediterrâneo na Europa.

Devido à igualdade morfológica entre as espécies do complexo *Leishmania donovani*, a identificação específica pode ser realizada por métodos moleculares, como a análise de isoenzimas pela eletroforese de enzimas multilocus, do inglês *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), considerada como método padrão ouro para caracterização e identificação de cepas de *Leishmania* (MOMEN e SALLES, 1985; CUPOLILLO et al., 1994).

A nomenclatura *Leishmania (L.) chagasi* e a hipótese de origem nativa ao Novo Mundo foram mantidas por muitos anos com base em diferenças identificadas nos perfis de fragmentos de kDNA de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum*, demonstradas pela digestão por endonuclease de restrição (JACKSON et al., 1984), pela descoberta de que um anticorpo monoclonal contra promastigotas de um dos parasitas não reconhecia as do outro (SANTORO et al., 1986) e ainda por estudos comparativos de radiorrespirometria (DECKER-JACKSON e TANG, 1982).

Entretanto, a classificação de *L. (L.) chagasi* tem sido contestada por estudos de cepas do complexo *L. donovani* isoladas de diferentes origens, utilizando marcadores moleculares que incluem: sequências codificantes e não-codificantes de DNA nuclear e/ou mitocondrial, espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS) (CUPOLILLO et al., 1995; DÁVILA e MOMEN, 2000; KUHLS et al., 2005), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (HIDE et al., 2001), análise de

polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) de minicírculo de kDNA (ALONSO et al., 2010; CORTES et al., 2006), tipagem de microssatélites multilocus (MLMT) (KUHLS et al., 2007, 2011), amplificação do gene mini-exon (SUKMEE et al., 2008) e da proteína de choque térmico 70 kDa (*hsp70*) (FRAGA et al., 2010), entre outros.

A maioria desses estudos sugere que a taxonomia do complexo *L. donovani* necessita ser revisada, uma vez que o perfil de microssatélites, a filogenia baseada na proteína de choque térmico *hsp70* e as sequências de DNA analisadas são idênticas para ambas as espécies e não há diferenças plausíveis que justificariam a separação entre *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* (FRAGA et al., 2010; KUHLS et al., 2007, 2011; LEBLOIS et al., 2011, MAURICIO et al., 2000, SCHONIAN et al., 2010).

A história evolucionária de *L. (L.) infantum*, considerada como sinônimo sênior de *L. (L.) chagasi*, também tem sido contestada. Diversos autores têm sugerido que *L. infantum* tenha sido importada da Europa durante a colonização portuguesa e espanhola a partir de cães e roedores infectados (KILLICK-KENDRICK, 1985; LEBLOIS et al., 2011; MOMEN e CUPOLILLO, 2000; RIOUX et al., 1990). Ao estudarem a estrutura populacional do parasito, KUHLS et al. (2011) identificaram duas populações principais de *L. (L.) infantum* tanto para o Novo quanto para o Velho Mundo, destacando a elevada semelhança das populações do Novo Mundo e do sudoeste Europeu. Outro ponto que suporta esta teoria é a baixo polimorfismo das cepas de *L. (L.) infantum* do Novo Mundo.

Em 2002, ao considerar as diferenças descritas entre as espécies, SHAW (2002) propôs a denominação *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, tornando *L. (L.) chagasi* uma subespécie de *L. (L.) infantum*. LAINSON e SHAW (2005), LAINSON e RANGEL (2005) e LAINSON (2010) defenderam a manutenção do parasita em um nível subespecífico ao ponderarem a especificidade de hospedeiros e reservatórios das espécies de *Leishmania*, as características etiológicas, como o habitat silvestre de seu principal vetor, *Lu. longipalpis*, e as distinções moleculares e antigênicas já mencionadas. SHAW (2006) justificou a manutenção da nomenclatura subespecífica ao ressaltar que espécies de *Leishmania* são compostas de populações clonais cuja estrutura varia de acordo com o método de caracterização e que mais de um táxon de parasitas viscerais pode ocorrer numa mesma área geográfica. Portanto, este pode ser um ponto potencial de confusão, dado que diferentes grupos de pesquisa podem ou não examinar os mesmos parasitas e, assim, chegar a conclusões conflitantes.

Recentemente, análises filogenéticas na região do SSU rDNA V7V8 (sequência de DNA *barcode* de Trypanosomatidae) em agrupados de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* de diferentes hospedeiros e origens geográficas foram capazes de separar os isolados do Novo e Velho mundo (MARCILI et al., 2014). Com base nesta e nas demais diferenças previamente identificadas, os autores sugerem a manutenção no nome *L. (L.) infantum chagasi* e revitalizam a discussão acerca da origem de *L. (L.) chagasi*.

A ausência de um consenso na comunidade científica tem causado confusão na nomenclatura deste parasito e diferentes nomes têm sido utilizados (DANTAS-TORRES, 2006). Considerando que até o presente momento ainda não há uma nova classificação proposta para o gênero *Leishmania*, neste trabalho será adotada a nomenclatura *L. (L.) infantum*.

No Novo Mundo, *L. (L.) infantum* apresenta ampla distribuição geográfica estando presente em 15 dos 20 países da América Latina (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Martinica, México, Nicarágua, Paraguai, Suriname e Venezuela) (LAINSON e SHAW, 2005; SHAW, 2002) e no norte dos Estados Unidos (ROSYAL et al., 2003).

A tipagem de microssatélites multilocus de cepas de *L. (L.) infantum* do Novo Mundo indicou a existência de duas populações principais: uma população contém cepas do Paraguai, Brasil, Colômbia e Honduras e é composta pelo zimodema MON-1; a segunda contém cepas de Venezuela, Panamá, Costa Rica e Honduras e está relacionada com o zimodema não-MON-1 (KUHLS et al., 2011). No Brasil, utilizando a mesma técnica, foram identificados 66 genótipos distribuídos em três populações, sendo que uma delas ocorre principalmente (75%) no Estado de Mato Grosso do Sul (FERREIRA et al., 2012).

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor associado à transmissão de *L. (L.) infantum* nas Américas (DEANE e GRIMALDI, 1985). No entanto, *Pintomyia evansi* (Nuñez-Tova, 1924) foi incriminada como principal vetor na Colômbia (TRAVI et al., 1994) e como vetor alternativo na Venezuela (FELICIANGELI et al., 1999). Em Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia forattinii* tornaram-se suspeitas de atuarem no ciclo de transmissão como vetor alternativo (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998; PITA-PEREIRA et al., 2008). No Município de Bonito, localizado na região da Serra de Bodoquena, também no Estado de Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia almerioi* Galati & Nunes, 1999 parece

atuar na transmissão de *L. (L.) infantum* devido à elevada densidade populacional e ao encontro de exemplares infectados naturalmente pelo protozoário (SAVANI et al., 2009).

Os hospedeiros vertebrados conhecidos incluem os seres humanos e o cão doméstico, *Canis familiaris* Linnaeus, 1758. Entre os animais silvestres, a raposa *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 parece ser um importante reservatório natural no Nordeste (Ceará), Norte (Pará), e Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul) (DEANE, 1956; LAINSON e SHAW, 1987, 2005; MELLO et al., 1988).

Há relatos do encontro de cepas do parasita em gambás do gênero *Didelphis* no Bahia (SHERLOCK et al., 1984). Na Colômbia, *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 é considerado um importante reservatório (CORREDOR et al., 1989; TRAVI et al., 1994). HUMBERG et al. (2012) sugeriram que *Didelphis albiventris* Lund 1840 possa estar envolvido no ciclo urbano de transmissão da LV em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

1.2.2 *Leishmania (Leshmania) amazonensis*

Inicialmente, *L. (L.) amazonensis* era considerada como uma subespécie de *L. (L.) mexicana* (LAINSON e SHAW, 1987; SAF'JANOVA, 1982).

O parasito tem sido registrado na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai. No entanto, acredita-se que também ocorra em outros países da América do Sul, onde o vetor flebotomíneo é encontrado. No Brasil, encontra-se presente em todas as regiões, com destaque para a Região Amazônica (BRASIL, 2007; LAINSON e SHAW, 2005).

Entre os hospedeiros invertebrados descritos, encontram-se os flebotomíneos *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), principal vetor de *L. (L.) amazonensis* (LAINSON e SHAW, 1968; LAINSON et al., 1994), *Bichromomyia olmeca nociva* (Young & Arias, 1982) e *Bichromomyia reducta* (Feliciangeli, Ramirez Pérez & Ramirez, 1988) (FREITAS et al., 1989). Provavelmente, estes dois últimos têm um papel secundário na ecologia e transmissão do parasito (LAINSON e SHAW, 2005). Na Bolívia, *Pintomyia nuneztovari* (Ortiz, 1954) [sinônimo de *Lutzomyia nuneztovari anglesi* Le Pont & Desjeux, 1984 (Young & Duncan 1994)] foi encontrada naturalmente infectada com *L. (L.) amazonensis* (MARTINEZ et al., 1999). Em Mato Grosso do Sul, *Lu. longipalpis* também foi encontrada com infecção

natural pelo parasito áreas endêmica para leishmaniose cutânea e visceral canina (PAIVA et al., 2006; SAVANI et al., 2009).

Roedores do gênero *Proechimys* são os hospedeiros primários do parasito. Outros roedores como *Oryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Dasyprocta*, os marsupiais *Marmosa*, *Metachirus*, *Didelphis* e *Philander* e o canídeo silvestre *Cerdocyon thous*, são considerados hospedeiros secundários (ASHFORD, 2000; LAINSON et al., 1994; LAINSON e SHAW, 2005).

1.3 FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Constituem um grupo de insetos com registros de fósseis de cerca de 120 milhões de anos, conferindo-lhes uma origem extremamente antiga. Estão distribuídos por todo o mundo, e na atualidade, nas Américas, são conhecidas pouco mais de 900 espécies e cerca de 60 delas estão implicadas (suspeitas ou comprovadas) na transmissão de *Leishmania* (GALATI, 2014; GALATI et al., 2009; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Apesar do grande número de espécies descritas, ainda existe um importante déficit de conhecimento a respeito da biologia destes dípteros. Este fato pode ser explicado pelas dificuldades na descrição da biologia, visto que para estudar o ciclo biológico de uma espécie é necessário colonizá-la em laboratório (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Apesar de haver uma metodologia básica de criação experimental para flebotomíneos, ainda existe necessidade de adaptações para a obtenção de sucesso na manutenção de diferentes colônias (KILLICK-KENDRICK, 1979).

Como os demais dípteros, os flebotomíneos são holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa com quatro estádios larvais e uma fase de pupa que dá origem ao adulto. A duração dos diferentes estágios imaturos de ovo a pupa varia entre as espécies, havendo também a influência de fatores, como a temperatura, a umidade e a disponibilidade de alimento (BRAZIL e BRAZIL, 2003; VOLF e VOLFOVA, 2011).

As formas imaturas desenvolvem-se em criadouros constituídos por solos úmidos, ricos em matéria orgânica, ao abrigo da luz direta, entre raízes expostas, troncos de árvores, embaixo de folhas caídas e de pedras, em gretas de rochas, tocas de animais e ambientes antrópicos como chiqueiros, galinheiros, canis,

estábulo ou outros ecótopos nos quais as condições adequadas se fazem presentes. Muitas vezes o próprio criadouro funciona também como local de abrigo, sendo que estes variam de acordo com o microhabitat, estação do ano, umidade relativa do ar e também de acordo com a espécie. Pela fragilidade, as formas imaturas, necessitam de locais que as protejam de mudanças bruscas que ocorrem no meio ambiente (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; FORATTINI, 1973).

Ambos os sexos necessitam de açúcares em sua dieta. Embora tenha sido relatado o encontro de machos com sangue no tubo digestivo (SANTOS DA SILVA e GRÜNEWALD, 1999), apenas as fêmeas são consideradas hematófagas, sugando um largo espectro de animais como mamíferos, aves e animais de sangue frio (BAUM et al., 2015; BRITO et al., 2014; NGUMBI et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2008; TESH et al. 1972).

O sangue é necessário para o desenvolvimento ovariano e o número de ovos produzidos é diretamente proporcional à quantidade de sangue ingerido, porém, há também a possibilidade de autogenia, como já foi observado em alguns flebotomíneos, e de partenogênese, observada em laboratório para *Pintomyia mamedei* (Oliveira, Afonso, Dias & Brazil, 1994) (BRAZIL e OLIVEIRA, 1999; LEHANE, 1991) e *Deanemyia maruaga* (Alves, Freitas & Barrett, 2008) (ALVES et al., 2008).

A existência de concordância gonotrófica tem sido relatada com frequência para estes dípteros, porém, em algumas espécies têm sido observados dois repastos precedentes à oviposição (BRAZIL et al., 1991). Uma das explicações para esse comportamento é o fato de que as fêmeas sofrem com variações climáticas, como altas temperaturas e baixos níveis de umidade, e ficam com a capacidade de oviposição prejudicada, necessitando deste segundo repasto para manutenção hídrica (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

A atividade hematofágica predominante é a noturna, porém, os flebotomíneos podem exercê-la durante o dia principalmente em ambientes com pouca luminosidade como cavernas e áreas florestais (INFRAN et al., 2014; GALATI et al., 2006; GOMES et al., 1989).

Em inquérito entomológico realizado na área urbana de 18 municípios do Estado de Mato Grosso do Sul com transmissão de LV, foram capturados 34.799 espécimes de flebotomíneos pertencentes a 36 espécies, sendo *Lu. longipalpis*, *Lu.*

cruzi, *Lu. forattinii* e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) as espécies mais prevalentes (ALMEIDA et al., 2010).

Em Corumbá, a fauna flebotomínea descrita é composta por 12 espécies com destaque para *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, que foram as mais abundantes na região urbana da cidade (GALATI et al., 1997, CASARIL et al., 2014). Embora SANTOS et al. (2003) tenham relatado a presença de *Lu. longipalpis*, os demais estudos apontam a ausência desta espécie e o predomínio de *Lu. cruzi* (ALMEIDA et al., 2010; CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1997). Estes dados, associados ao estreito grau de parentesco entre ambas (SANTOS et al., 2013) e ao encontro de *Lu. cruzi* naturalmente infectada por *Leishmania* sustentam a hipótese de que esta espécie seja responsável pela transmissão do agente da LV na região (SANTOS et al., 1998, PITA-PERREIA et al., 2008). Ainda merece atenção o fato de que *Lu. forattinii*, espécie antropofílica, que foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* (PITA-PERREIA et al., 2008) esteja atuando no ciclo de transmissão da doença nas áreas rurais e urbanas da cidade (GALATI et al., 1997).

1.4 INTERAÇÃO *Leishmania* (*Leishmania*) spp. E FLEBOTOMÍNEOS

O desenvolvimento de *Leishmania* dentro do seu vetor (específico ou não) e, consequentemente, a interação parasito-vetor é um processo complexo que tem início quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado (KILLICK-KENDRICK, 1979). Para realizar a hematofagia, as fêmeas provocam microlesões com auxílio das peças bucais na pele dos hospedeiros vertebrados, dilacerando os tecidos e vasos sanguíneos superficiais para formar um pequeno poço de sangue que permite a alimentação (LANE, 1993; RIBEIRO et al., 1986).

Após este processo inicial, as amastigotas ingeridas serão submetidas a uma série de transformações estruturais e morfológicas induzidas pelas mudanças nas condições ambientais dentro do inseto vetor, como mudança de pH e temperatura (BATES e ROGERS, 2004; SANTOS et al., 2008). As transformações primárias (evolução para os morfotipos de promastigota) iniciam-se cerca de 6 a 12 h após o repasto e ocorrem dentro da matriz peritrófica, definida como uma matriz semipermeável de proteínas, glicoproteínas e quitina que permite a difusão de enzimas hidrolíticas do flebotomíneo para o interior do bolo alimentar e de nutrientes

provenientes da digestão para fora dele, mas impede a saída dos parasitos (PIMENTA et al., 2012; SECONDINO et al., 2005).

O primeiro morfotipo observado após a ingestão de amastigotas é a promastigota procíclica, uma forma replicativa com pouca motilidade que está confinada à matriz peritrófica (BATES, 2007; LAWYER et al., 1987). Alguns autores relatam a ocorrência de uma taxa de mortalidade considerável de parasitas durante esta fase devido a mudanças na superfície do glicocálix presente na membrana celular do parasito, que o torna temporariamente vulnerável a ação da tripsina excretada pelo inseto como resposta a presença de alimento no intestino médio (FREITAS et al., 2012; PIMENTA et al., 1997; ROGERS et al., 2002).

Entretanto, tem sido proposto que algumas espécies de *Leishmania* apresentam estratégias para inibir ou retardar os efeitos prejudiciais das enzimas digestivas (DILLON e LANE, 1993; SACKS e KAMHAWI, 2001). Entre os fatores descritos, destaca-se a modulação da atividade proteolítica do inseto pela expressão de moléculas superfície do parasito, tais como: lipofosfoglicanos (LPG), glicoinositolfosfolípides (GIPL), proteofosfoglicanos (PPG), proteínas ancoradas a GPI (GP63) (ILG et al., 1999; McCONVILLE e FERGUSON, 1993; TURCO e DESCOTEAUX, 1992). Além da expressão de moléculas superficiais como fator de modulação, também foi observado a secreção de fosfoglicanos (PG), proteofosfoglicanos (sPPG) e fosfatases ácidas (sAP) (ILG, 2000; ILG et al., 1999).

Depois de alguns dias, os parasitas começam a diminuir a sua replicação e diferenciam-se em formas alongadas com intensa motilidade, as promastigotas nectomonas. Estas são formas migratórias que se acumulam e se fixam, via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal, ao intestino médio após a fuga da matriz peritrófica. Acredita-se que este escape seja mediado pela ação da enzima quitinase secretada pelo próprio parasita (SCHLEIN, et al., 1991, SHAKARIAN e DWYER, 2000) e também pelo inseto (RAMALHO-ORTIGAO et al., 2005). Já adesão ao epitélio é desempenhada principalmente pelo LPG, entre outros fatores (PIMENTA et al., 1992; SOARES et al., 2002).

A degeneração da matriz peritrófica é acompanhada pela excreção do bolo fecal via piloro e íleo. Nesta etapa, a fixação e/ou ancoramento das nectomonas ao epitélio intestinal são essenciais para evitar sua eliminação junto ao conteúdo fecal (KILLICK-KENDRICK, 1974; LAWYER et al., 1987, 1990; PIMENTA et al., 2012). Além disto, a fixação às microvilosidades permite a migração em direção à região

anterior do intestino médio, região torácica, imediatamente após a válvula estomodeal (cárdia), que é a junção entre os intestinos anterior e médio. Portanto, este período caracteriza a fase de estabelecimento da infecção em um vetor, ou seja, a persistência e manutenção do parasito dentro do flebotomíneo (BATES, 2007; SACKS e KAMHAWI, 2001; WALTERS et al., 1992).

Muitos estudos têm debatido a importância da especificidade da adesão das nectomonas ao intestino, caracterizando uma relação espécie-específica que depende do polimorfismo da molécula LPG e está relacionado à sua função como ligante do parasito aos receptores do intestino do díptero. Em muitos casos, esta relação pode explicar a competência vetorial espécie-específica (COELHO-FINAMORE et al., 2011; KAMHAWI, 2000; PIMENTA et al., 1992, 1994, 2012; SOARES et al., 2002).

Ao atingirem a região torácica, as nectomonas transformam-se em promastigotas leptomonas, uma forma mais curta e replicativa. Estas são responsáveis pela secreção do *promastigote secretory gel* (PSG), uma substância gelatinosa que envolve os parasitos e exerce função essencial na transmissão do parasito (ROGERS et al., 2002). Outras formas podem ser observadas em menor quantidade nesta fase, como as promastigotas haptomonas (curtas e largas) e as promastigotas paramastigotas de corpo pequeno (PIMENTA et al., 2012).

Conforme a espécie de flebotomíneo e condições ambientais, em aproximadamente cinco dias todo bolo fecal será excretado. Neste momento pode ser observada a formação do *PSG plug*, uma massa de parasitos envolta pelo PSG que se estende da porção anterior do intestino médio até o intestino anterior na região torácica (BATES, 2007; LAWYER et al., 1990; PIMENTA et al., 2012; SACKS e KAMHAWI, 2001; ROGERS et al., 2002, 2004).

Finalmente, as formas promastigotas leptomonas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, forma evolutiva infectante ao hospedeiro vertebrado. As promastigotas metacíclicas possuem corpo celular pequeno, flagelo longo, não se dividem e não apresentam capacidade de aderência ao epitélio intestinal (BATES, 2007; PIMENTA et al., 1992). Também apresentam alta motilidade e estão livres no lúmen intestinal, podendo migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probóscida (PIMENTA et al., 2012; ROGERS et al., 2002, 2004). Para a combinação *Lu. longipalpis* e *Leishmania (L.) infantum*, formas progastigotas

metacíclicas podem ser observadas a partir do quatro dias após o repasto sanguíneo em uma fonte de infecção experimental (FREITAS et al., 2012).

Duas hipóteses têm sido propostas para o processo de transmissão de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* ao hospedeiro: a primeira diz respeito à inoculação do parasito de forma ativa e/ou passiva; a segunda refere-se à ocorrência de regurgitação do parasito durante a transmissão natural (KILLICK-KENDRICK, 1986; WARBURG E SCHLEIN, 1986). A hipótese de inoculação baseia-se principalmente no encontro de formas infectantes na probóscida (BATES, 2007). Estas migrariam até a probóscida, obstruindo-a mecanicamente e impedindo a ingestão de sangue. Consequentemente, a fêmea tentaria, sem sucesso, se alimentar repetidas vezes, inserindo o aparelho bucal na pele do hospedeiro por curtos períodos de tempo. Deste modo, os músculos do aparelho picador se relaxariam, o sangue ingerido seria regurgitado e as formas infectantes inoculadas na pele do mamífero hospedeiro (DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012; KILLICK-KENDRICK et al, 1977a).

No entanto, vários fatores suportam a ideia de regurgitação do parasito, como a lesão tecidual da válvula estomodeal via quitinase excretada pelo parasita (SCHLEIN et al., 1992; VOLF et al., 2004), o bloqueio físico causado pelo *PSG plug*, que seria removido por regurgitação, liberando assim o fluxo para um novo repasto sanguíneo (ROGERS et al., 2002; ROGERS e BATES, 2007) e a comparação entre o número de parasitas transmitidos por insetos infectados e os presentes no intestino anterior deste flebotomíneos (ROGERS et al., 2004). Discute-se ainda que o papel do parasita na modelação e manipulação do tempo de alimentação sanguínea para que este coincida com o pico de formas infectantes no *PSG plug* e com o bloqueio na porção anterior do intestino médio, o que levaria a múltiplas tentativas de repasto, como demonstrado para as combinações de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum* em *Lu. longipalpis* (ROGERS e BATES, 2007).

Embora as formas intermediárias de promastigotas presentes no inseto vetor (natural ou permissivo) infectado sejam conhecidas, com exceção da promastigota metacíclica, ainda permanece incerto como são originados e quais condições são determinantes ao surgimento de cada uma delas (PIMENTA et al., 2012).

Algumas espécies de flebotomíneos suportam ou permitem a manutenção e desenvolvimento da infecção por mais de uma espécie de *Leishmania*, recebendo a denominação de vetores permissivos (KAMHAWI, 2006; PIMENTA et al., 1994;

ROGERS et al., 2002, 2004). Acredita-se que o mecanismo de adesão do parasito ao intestino médio desta categoria de vetores seja diferente, uma vez que a adesão via LPG é espécie-específica, como citado anteriormente (VOLF e MYSKOVA, 2007).

Em várias espécies de flebotomíneos permissivos, o ancoramento do parasito está relacionado à presença da fração terminal da glicoproteína N-acetil-galactosamina no intestino médio e à ocorrência de lectinas na superfície de *Leishmania*; portanto, independente do LPG. Esta nova modalidade de ligação tem implicações importantes para a transmissão e evolução do parasita, uma vez que pode contribuir para a dispersão de *Leishmania* devido à sua adaptação em novos vetores (MYSKOVA et al., 2007).

Com relação a possíveis benefícios aos flebotomíneos, resultantes da interação parasito-vetor, experimentos com *L. (L.) mexicana* e *Lu. longipalpis* demonstraram que a colonização bacteriana e fúngica reduziu o potencial de estabelecimento do parasito nos flebotomíneos. No entanto, flebotomíneos infectados com *Leishmania* sobreviveram a uma exposição bacteriana capaz de matá-los. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram a ocorrência de pressão evolutiva para a manutenção da associação *Leishmania*-vetor (SANT'ANNA et al., 2014).

1.4.1 Capacidade vetorial

A capacidade vetorial de um inseto hematófago pode ser definida como o número esperado de picadas infectivas que eventualmente surgiria do total de mosquitos que picassem uma única fonte de infecção em um único dia (SMITH et al., 2012). Os modelos iniciais propostos para estimar a capacidade vetorial foram desenvolvidos para populações de mosquitos do gênero *Anopheles* a partir de estudos para o controle de malária quando GARRET-JONES (1964) e REISEN (1989a) desenvolveram um modelo que considerava a densidade do vetor em relação ao hospedeiro, a atratividade ao hospedeiro, a proporção de fêmeas que exerceram a hematofagia, a probabilidade de sobrevivência estimada em campo, a duração do ciclo gonotrófico, a duração do período de incubação extrínseco e a proporção de fêmeas infectadas com formas infectivas.

Entre os parâmetros que norteiam a incriminação dos flebotomíneos como vetores de *Leishmania* para a população humana, destacam-se (1) o comportamento antropofílico, (2) a distribuição geográfica coincidente com a da doença, (3) a competência vetorial e a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana, (4) o grau de relacionamento com os reservatórios e com o homem, (5) a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito, (6) a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório e (7) a capacidade desses insetos se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasita por meio da picada em modelos experimentais (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK; WARD, 1981). Após revisão destes critérios, READY (2013) propôs a inclusão de novos parâmetros para a comprovação vetorial de um flebotomíneo: modelagem matemática com o uso de dados retrospectivos para demonstrar que o vetor é essencial para manter a transmissão com ou sem o envolvimento de outras espécies e que a incidência da doença diminui significativamente com a redução da densidade do vetor específico.

Aspectos gerais relacionados à interação que ocorre entre as diferentes espécies de *Leishmania* e os flebotomíneos são importantes e indicam se determinado inseto é refratário ou susceptível à infecção pelo protozoário, além de determinar a competência vetorial desses dípteros, tornando-os possíveis hospedeiros e vetores competentes. Dentre estes fatores, ganham importância a capacidade que os parasitas apresentam de (PIMENTA et al., 2003):

- a) resistirem às atividades enzimáticas digestivas presentes no intestino médio do inseto no momento da digestão sanguínea;
- b) escaparem da matriz peritrófica que envolve o bolo alimentar;
- c) aderirem ao epitélio intestinal do inseto no momento da excreção do resto alimentar; e
- d) completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, finalizando com o desenvolvimento e diferenciação em formas infectantes.

Para estudar a capacidade vetorial de flebotomíneos, OVALLOS (2011) adaptou o modelo proposto por REISEN (1989) de modo que a probabilidade de sobrevivência, o período de incubação extrínseca e, conseqüentemente, a expectativa de vida infectiva, passaram a ser obtidas diretamente por meio do acompanhamento de uma coorte. Neste estudo, foi demonstrado que *Lu.*

longipalpis apresentou capacidade vetorial para *L. (L.) infantum* 18,7 vezes maior à de *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), e esta, 45 vezes maior à de *Migonemya migonei* (França, 1920). Diante destes resultados, foi possível sugerir que *Pi. fischeri* estaria envolvida no ciclo epidemiológico da LV na região metropolitana de São Paulo, no Estado de São Paulo.

1.5 DADOS AMBIENTAIS

A relação entre a exposição ambiental a fatores de risco e condições de saúde tem sido estudada com o auxílio de geotecnologias, como o geoprocessamento e o sensoriamento remoto, que fornecem informações importantes para a vigilância, monitoramento e mapeamento de riscos de diversas doenças, em especial, as transmitidas por vetores (BARCELLOS; BASTOS, 1996; BECK; LOBITZ; WOOD, 2000).

O geoprocessamento é o conjunto de técnicas de coleta, tratamento, manipulação, análise e apresentação de dados espaciais ou de informações geográficas georreferenciadas, no qual há utilização de diferentes sistemas. Os sistemas de digitalização de imagens, de conversão de dados, de modelagem espacial e o sistema de informações geográficas, usualmente denominado de SIG, são alguns exemplos. Outra ramificação do geoprocessamento com grande utilidade em saúde pública é o sensoriamento remoto (APARICIO, 2001; PARANHOS FILHO, 2008; PINA, 1998). O geoprocessamento pode ser caracterizado como uma tecnologia interdisciplinar, pois permite a convergência de diferentes ramos da ciência para o estudo de fenômenos ambientais e urbanos (CÂMARA; MONTEIRO, 2001). Já o termo sensoriamento remoto é entendido como a tecnologia que permite a aquisição de informações (dados ou imagens) de objetos sem o contato físico com auxílio de um sistema sensor e tem como objetivo estudar o ambiente terrestre por meio do registro e análise de interações entre a radiação eletromagnética e a superfície terrestre (NOVO, 2008; PARANHOS FILHO, 2008).

Estudos entomológicos que analisam o comportamento de insetos vetores devem considerar, além das questões inerentes ao próprio vetor, as características ambientais específicas de cada região, como o nível de urbanização, a presença de matas ou de fragmentos remanescentes, as variações climáticas bem como a

variação temporal e espacial da incidência da enfermidade avaliada (MEDRONHO, 1995).

Com base no exposto, torna-se evidente a necessidade da adoção de metodologias capazes de demonstrar de modo eficiente a influência exercida pelo meio ambiente, como a vegetação e o clima, sobre o comportamento dos vetores de importância médica. Deste modo, a associação das geotecnologias aos estudos entomológicos pode auxiliar em pesquisas e avaliações em saúde pública, permitindo não só o mapeamento da região estudada, mas também a qualificação e quantificação de fatores ambientais e a extrapolação de uma escala local para outra escala regional (SCHOLTE e LEPPER, 1991; WASHINO e WOOD, 1994).

A ocorrência de flebotomíneos está associada à presença de matas, embora também possam ser encontrados em áreas abertas e em ambientes urbanos (GALATI et al., 2003, 2006; LAINSON e RANGEL, 2005). Tanto em escala regional como local, os modelos espaciais e temporais das distribuições das populações de flebotomíneos são influenciados pela temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e elevação (FORATINI, 1973). Assim, ao analisar a vegetação, analisam-se indiretamente todos esses fatores (APARICIO, 2001).

Diferentes índices de vegetação podem ser utilizados para o estudo e avaliação da cobertura vegetal. Dentre os já descritos na literatura, destaca-se o índice de vegetação por diferença normalizada, do inglês *normalized difference vegetation index* (NDVI), que apresenta relação direta com a biomassa vegetal da região estudada, permite caracterizar alguns aspectos biofísicos da vegetação e é indicativo da quantidade de fitomassa da região, ou seja, quanto maior o índice, maior será a densidade da vegetação (APARICIO, 2001; PONZONI e SHIMABUKURO, 2007; ROSA, 2003).

Outra maneira de mensurar a quantidade de fitomassa presente em determinado espaço geográfico dá-se pela medição direta em campo do percentual de cobertura vegetal por meio de um densiômetro esférico. O densiômetro esférico é muito útil para obtenção de estimativas precisas e confiáveis de cobertura vegetal de áreas pequenas a um custo menor (STUMPF, 1993).

A ecologia de paisagem estuda os conjuntos de habitats situados numa mesma região, bem como as interações existentes entre eles. Os componentes espaciais da paisagem como a área, a complexidade e a heterogeneidade espacial influenciam de forma direta a diversidade e distribuição dos organismos afetando

variáveis como a presença e a abundância de espécies e suas interações bióticas (CHUST et al., 2003; DAJOZ, 2005; HIRAO et al., 2008).

Considerando a importância das geotecnologias nos estudos de vetores, imagens de satélite foram utilizadas para estudar vetores do agente da leishmaniose tegumentar na cidade de Itapira, Estado de São Paulo, onde APARICIO e BITENCOURT (2004) delimitaram espacialmente as zonas de contato entre o homem e *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Ny. whitmani*, com auxílio de sensoriamento remoto e técnicas de geoprocessamento para analisar a cobertura vegetal por meio do NDVI. Foi sugerido um possível padrão paisagístico no qual a transmissão da doença estaria relacionada não apenas à presença de mata, mas também à outros tipos de vegetação ao redor dos fragmentos (fora da mata), desde que suficientemente densos.

Em Mato Grosso do Sul, OLIVEIRA et al. (2012) demonstraram a associação entre a abundância de *Lu. longipalpis* e a presença de vegetação, quantificada por meio do NDVI e do percentual de fitomassa na área urbana de Campo Grande.

1.6 JUSTIFICATIVA

As diferenças geográficas regionais, a diversidade ecológica com muitas espécies de flebotomíneos como possíveis vetores e, aproximadamente, 100 espécies de animais como potenciais reservatórios dificultam as medidas de controle das leishmanioses. A impossibilidade do acesso e produção de drogas ativas, prescrição incorreta e a pouca compreensão sobre a doença, impedem a atuação correta nos casos diagnosticados e perpetuam a infecção antroponótica, estimulando a resistência às drogas (GONTIJO e MELO, 2004; GUERIN et al., 2002; MURRAY et al., 2005). Este cenário demonstra a necessidade de uma demanda crescente por novas estratégias de prevenção e educação em saúde nas leishmanioses.

Embora se conheçam muitos aspectos epidemiológicos e clínicos das leishmanioses (GONTIJO e MELO, 2004; GUERIN et al., 2002; OLIVEIRA ALL et al., 2006), bem como o papel dos flebotomíneos na transmissão de várias espécies de *Leishmania* (GALATI et al., 1997, 2003; LAINSON e RANGEL, 2005), a capacidade e a competência vetorial dos insetos suspeitos ou comprovados têm sido pouco avaliadas (CASANOVA et al., 2009).

O encontro de flebotomíneos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, exceto se vetor comprovado, os encaixam no conceito de vetores permissivos e reafirmam a necessidade de investigação de outras espécies que poderiam atuar na transmissão desse agente, principalmente em áreas com casos autóctones de LV notificados, porém sem o relato do encontro de *Lu. longipalpis*, como ocorre em Corumbá e Ladário. Portanto, é necessária a investigação da capacidade vetorial desse flebotomíneo na transmissão da *L. (L.) infantum*, comparando-a com a da espécie reconhecidamente vetora desse agente, para se dimensionar o risco de transmissão dessa parasitose em uma dada área. De acordo com SECONDINO et al. (2012), estudos com as espécies de vetores brasileiros são, assim, necessários para compreender os mecanismos subjacentes de parasitas, vetor e hospedeiros vertebrados, bem como as complexas interações entre os três, que suportam o início da doença e persistência.

O estudo da distribuição sazonal de flebotomíneos suspeitos de participarem do ciclo de transmissão do parasito é importante, uma vez que os picos de abundância representam um fator de risco, o que poderia influenciar diretamente o valor da capacidade vetorial calculada. De modo semelhante, o estudo dos atributos de paisagem como a cobertura vegetal fornecerá informações a respeito de possíveis condições que favoreçam a ocorrência e o aumento da abundância destes insetos.

Essas informações são fundamentais para o conhecimento da disseminação da LV e para o planejamento das medidas de controle vetorial, uma vez que as ações preconizadas pelo Ministério da Saúde centram-se apenas no controle de *Lu. longipalpis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em condições laboratoriais a capacidade e a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum*, provenientes de área com transmissão de leishmaniose visceral em Corumbá, Mato Grosso do Sul, assim como sua distribuição sazonal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram elencados:

- a) estimar a capacidade vetorial para *L. (L.) infantum*;
 - i. estimar a probabilidade de sobrevivência diária e a expectativa média de vida das fêmeas após o xenodiagnóstico em hospedeiro infectado;
 - ii. estimar a taxa de infecção experimental por *L. (L.) infantum*;
 - iii. estimar o período de incubação extrínseco de *L. (L.) infantum*;
 - iv. avaliar a atratividade do homem e do cão a *Lu. cruzi*;
- b) avaliar a competência vetorial de *Lu. cruzi*;
- c) investigar a infecção natural por *L. (L.) infantum* em fêmeas selvagens;
- d) avaliar a distribuição sazonal de *Lu. cruzi*; e
- e) verificar a associação entre a abundância de *Lu. cruzi* e os índices de cobertura vegetal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

Este estudo foi realizado de abril de 2012 a março de 2014 no perímetro urbano do Município de Corumbá (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" O; 118 m. a. n. m), que está localizado na porção noroeste do Estado de Mato Grosso do Sul, região do Pantanal Sul-mato-grossense, fazendo fronteira com a Bolívia (Figura 1). O município possui área total estimada de 64.962,8 km², o que representa 18,19% da extensão territorial do Estado. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2014 a população total estimada era de 108.010 habitantes, com densidade demográfica de 1.60 (hab/km²), sendo que 90% residem no perímetro urbano da cidade (IBGE, 2014).

Figura 1 – Área de estudo: localização geográfica do Município de Corumbá.

3.2 EXPERIMENTOS DE CAMPO

3.2.1 Capturas de *Lutzomyia cruzi* para cultivo em laboratório

Os espécimes de *Lu. cruzi* foram capturados em galinheiros localizados em duas residências na região periférica do Município de Corumbá (bairros Maria Leite, Centro e Nova Corumbá, Figura 2) com auxílio de aspiradores elétricos de sucção e armadilhas luminosas automáticas. Os insetos vivos foram transferidos para gaiolas de transporte em náilon (30 x 30 cm), cobertas com toalha umidecida e acondicionadas em caixas de isopor revestidas internamente com gesso. Para garantir a sobrevivência dos flebotomíneos durante o transporte ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande, fatias de maçã foram ofertadas no interior da gaiola como fonte de alimento e água. Posteriormente, os espécimes foram utilizados para estabelecimento e manutenção da colônia, conforme descrito no item 3.3.1.

3.2.2 Distribuição sazonal

A distribuição sazonal foi avaliada por meio da instalação semanal de armadilhas luminosas automáticas tipo CDC de abril de 2012 a março de 2014. Cinco residências foram selecionadas por conveniência com auxílio do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Corumbá em bairros com notificação de casos humanos de LV no ano anterior ao início das coletas (Figura 2). Em cada residência, foram instaladas duas armadilhas na área peridomiciliar das 17:00 às 7:00 h.

Após o recolhimento das armadilhas, os espécimes foram eutanasiados com éter, triados para a remoção de outros insetos e mantidos a -20 °C até o transporte ao Laboratório de Parasitologia da UFMS para a identificação específica de acordo com GALATI (2003). Todos os machos foram clarificados e montados em lâmina para a identificação. Até o sexto mês de coleta (setembro/2012), as fêmeas também foram clarificadas e montadas. Após este período, as fêmeas capturadas sem resquícios de sangue no intestino, depois de identificadas pela morfologia da espermateca, foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL com álcool isopropílico para investigação de infecção natural por *Leishmania*.

Figura 2 – Distribuição espacial dos pontos de coleta semanais para a avaliação da distribuição mensal de flebotomíneos, Corumbá, MS, abril/2012 a março/2014.

Número de 1 a 5 indicam os locais (bairros) de coletas de flebotomíneos. 1 = Centro; 2 = Maria Leite; 3 = Cristo Redentor; 4 = Popular Nova; 5 = Nova Corumbá. A área urbana de Corumbá está representada em uma imagem GeoEye (20/08/2012) na composição falsa-cor.

3.2.3 Atratividade humana e canina aos flebotomíneos

A atratividade humana e canina aos flebotomíneos foi avaliada por meio de experimentos mensais durante março de 2013 a fevereiro de 2014. Para tal, utilizou-se uma adaptação do método descrito por PINTO et al. (2001), que consiste na utilização de barracas de poliéster impermeável (205 x 145 x 105 cm) com dois orifícios telados para a circulação do ar: um para a entrada e outro para a saída (Figura 3). No orifício para a entrada de ar foi acoplado um *cooler* com um dispositivo de controle da velocidade do ar introduzido na barraca. Do lado de fora, em frente ao outro orifício, o de saída do ar, foi instalada uma armadilha automática tipo CDC sem lâmpada para capturar os flebotomíneos atraídos pelo ar expelido.

Em cada experimento foram utilizadas duas barracas que permaneciam montadas entre 18:00 e 6:00 h. No interior de uma, havia um humano e na outra, um cão com ração e água *ad libitum* durante as 12 h de execução do experimento.

Estas barracas foram armadas simultaneamente no mesmo peridomicílio (Bairro Maria Leite, Figura 2), distando aproximadamente 18 metros uma da outra, por duas noites consecutivas por mês. A posição de ambas foi alternada a cada noite. Foram feitas 24 repetições seguindo o método descrito acima para avaliar a atratividade canina e humana à espécie alvo do estudo. Ressalta-se que embora a residência utilizada para este experimento também tenha sido utilizada para a avaliação da distribuição mensal de flebotomíneos com armadilhas luminosas tipo CDC, as duas atividades (instalação de CDC e experimentos de atratividade) foram conduzidas em dias distintos.

Figura 3 – Barraca utilizada nos experimentos de atratividade humana e canina aos flebotomíneos.

A: vista frontal, número 1 indica o dispositivo (cano PVC 1000 mm telado) para saída de ar e 2 indica o dispositivo (cano PVC 1000 mm telado) para entrada de ar com *cooler* [não mostrado na figura] para ajuste de velocidade; B: vista em planta da barraca.

Como alternativa ao este método inicial, a atratividade canina também foi avaliada por coletas (aspiração manual) realizadas diretamente sobre cães. Para minimizar a interferência da possível atratividade humana, realizou um ciclo de cinco min de coleta sobre o cão e arredores (canil) com 10 min de pausa. Foram feitas quatro coletas durante o período de estudo.

Realizou ainda uma tentativa de coleta baseada no princípio utilizado pela armadilha tipo Disney (DORVAL et al., 2007). Discos metálicos (35 cm de diâmetro), semelhantes a assadeiras de pizza, lubrificados com óleo de rícino na superfície, foram fixados com auxílio de fita dupla face nas paredes internas de três canis durante três noites. Em cada canil foram utilizados três discos, ou seja, um em cada

parede interna. Ambos os métodos alternativos descritos acima (aspiração e coleta com os discos metálicos) foram realizadas no peridomicílio de residências da área urbana de Município de Corumbá.

3.3 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

3.3.1 Estabelecimento de colônia

A partir de fêmeas capturadas nos locais acima discriminados, foram estabelecidas as colônias de acordo com protocolo de KILLICK-KENDRICK et al. (1977b) e RANGEL et al. (1986) no insetário do Laboratório de Parasitologia Humana da UFMS. As paredes, portas e janelas são vedadas, há um mata insetos elétrico e uma anteporta telada com uma cortina de ar para evitar a fuga dos espécimes criados nas colônias.

Os adultos (machos e fêmeas) coletados em campo foram transferidos com o auxílio de um capturador individual adaptado para gaiolas de tecido montadas em armação de metal e providas de uma manga para introdução dos insetos, para o acasalamento e repasto sanguíneo; os adultos foram mantidos nas gaiolas por 48 h após o repasto, quando então as fêmeas foram ser transferidas individualmente para os frascos individuais para postura e obtenção da primeira geração (F₁). Os insetos foram mantidos a 25-27 °C e umidade de 70 a 80%.

Para a alimentação larval foi utilizado fígado liofilizado. A alimentação sanguínea dos adultos ocorreu em hamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) sadios e jovens anestesiados com xilazina e quetamina em dosagem adequada ao peso. Fatias de maçã foram oferecidas como fonte de açúcar aos insetos adultos.

Modificações e adaptações realizadas neste método são apresentadas no artigo 1 desta tese (item 4.1).

3.3.2 Infecção experimental com *Leishmania*

As tentativas de infecção experimental de *Lu. cruzi* foram realizadas por meio de xenodiagnóstico em cães e em hamsters.

Nos experimentos de infecção experimental por *L. (L.) infantum* foram utilizados cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande. Todos os animais apresentavam sintomatologia específica para leishmaniose visceral canina, sorologia e exame parasitológico direto positivos para *Leishmania*.

Para a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, foram utilizados dois hamsters infectados experimentalmente (cepa IFLA/BR/1967/PH8 fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou [CPqRR/FIOCRUZ-BH]) por via intradérmica no coxim plantar das patas traseiras. Durante o xenodiagnóstico os animais apresentavam lesões nodulares nas patas traseiras e no focinho.

O experimento com cães foi repedido seis vezes, cada uma delas com um animal diferente, sempre das 18:00 às 19:00 h. Inicialmente, o cão sedado (tiopental sódico via intramuscular 40 a 80 mg/kg) foi colocado no interior de uma gaiola de náilon dividida em dois compartimentos (1,90 x 0,90 x 1,80 m) (Figura 4). Em seguida, machos e fêmeas de *Lu. cruzi* de primeira geração (F₁) com três a quatro dias de vidas foram soltos no interior desta. A exposição do cão aos insetos durou cerca de uma hora em todas as tentativas. Decorridos os 60 min, os espécimes foram aspirados com capturador elétrico manual e transferidos para uma gaiola de náilon menor (30 x 30 cm), que foi envolta com uma toalha umedecida. Após 24h, as fêmeas foram individualizadas em potes de acrílico (2,50 x 3,50 cm) revestidos de gesso no fundo para a avaliação dos demais parâmetros descritos a seguir. Os potes foram vedados com tampa plástica que contem um orifício central (1,20 cm de diâmetro) revestido de tecido de náilon, sobre o qual foram colocados pequenos cubos de maçã. Dois grupos foram obtidos e acompanhados: um grupo de fêmeas alimentadas com sangue e outro de não alimentadas.

Os potes com as fêmeas individualizadas de ambos os grupos (alimentadas e não alimentadas) foram mantidos em um recipiente retangular de polietileno (34 x 14 cm), forrado na base com papel filtro umedecido e mantido com a tampa entreaberta dentro de uma câmara incubadora biológica B.O.D. MA-414® (Marconi, São Paulo, BR), com temperatura de 27-28 °C e umidade superior a 80%. Diariamente, os potes foram inspecionados três vezes ao dia (08:00, 14:00 e 20:00 h) para acompanhamento da mortalidade e oviposição, o que permitiu avaliar a sobrevida

diária (expectativa de vida após o xenodiagnóstico) e o ciclo gonotrófico (mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição).

Para os experimentos com os hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, diferindo apenas no tamanho da gaiola utilizada (30 x 30 cm) usada para a exposição dos animais aos flebotomíneos. Foram realizadas três repetições, sendo as duas últimas com o mesmo animal.

Figura 4 – Gaiola de náilon utilizada para o xenodiagnóstico em cães.

A: vista em planta; B: vista lateral; C: visão tridimensional, pontos 1-2 e 3-4 são ligados por zíper de metro com curso de abertura duplo que permite manuseio pelo lado de fora e de dentro da gaiola.

3.3.3 Taxa de infecção experimental e período de incubação extrínseco

A taxa de infecção foi obtida por meio da dissecação das fêmeas que morriam diariamente e da positividade para o DNA de *Leishmania* na reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, na ausência de fêmeas mortas naturalmente, uma amostra de duas a três fêmeas alimentadas foi sedada e dissecada para avaliar o período de incubação extrínseco em relação ao parasito. A técnica de dissecação foi realizada de acordo com JOHNSON et al. (1963) para expor o intestino e a espermateca das fêmeas e, conseqüentemente, pesquisar a presença de flagelados e confirmar a espécie de flebotomíneo. Após a dissecação e pesquisa de flagelados, o conteúdo da lamínula e do tubo digestivo dos espécimes, com presença ou não de flagelados, foi transferido e conservado individualmente em microtubos de 1,5 mL com álcool isopropílico. Em algumas ocasiões, especialmente na ocorrência de infecção maciça, após a transferência do material para o microtubo, tentou-se fixar solução de Errecart e corar com Giemsa o conteúdo residual presente na lâmina.

A taxa de infecção de *Lu. cruzi* para cada espécie de *Leishmania* foi calculada pela razão entre número de fêmeas positivas na PCR e o total de fêmeas alimentadas. As frequências de fêmeas potencialmente infectadas foram obtidas pela razão do número de fêmeas com pelo menos uma forma infectante entre os morfotipos observados de promastigota nos intestinos anterior e/ou torácico e total de fêmeas infectadas. A identificação das formas infectantes, as promastigotas metacíclicas, foi realizada considerando-se a localização (intestino anterior e região anterior do intestino médio) e a morfologia dos flagelados (corpo alongado com flagelo três ou mais vezes maior que o corpo) (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; ROGERS et al., 2002).

3.3.4 Sobrevida

As funções de sobrevida para os grupos de fêmeas alimentadas com sangue e não alimentadas, infectadas e não infectadas foram estimadas utilizando-se o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier. E, a partir das curvas estimadas, foram calculadas as medidas descritivas média e mediana. Adicionalmente, as curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando o teste *logrank*.

O estimador não paramétrico de Kaplan-Meier é, conforme COLOSIMO e GIOLO (2006), definido por:

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j < t} \left(\frac{n_j - d_j}{n_j} \right) = \prod_{j:t_j < t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j} \right),$$

em que:

- $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ são os k tempos distintos e ordenados em que ocorreram falhas (morte de fêmeas);
- d_j é o número de falhas em t_j , $j = 1, 2, \dots, k$; e
- n_j é número de fêmeas vivas (sob risco) em t_j , $j = 1, 2, \dots, k$, ou seja, as fêmeas que não morreram ou não tiveram morte induzida até o dia anterior a t_j .

Na presença de observações censuradas (fêmeas anestesiadas para dissecação), a estimativa mais adequada para a mediana é obtida por meio de interpolação linear da curva de Kaplan-Meier e a estimativa do tempo médio de sobrevivência é dada por (COLOSIMO e GIOLO, 2006):

$$\hat{t}_m = t_1 + \sum_{j=1}^{k-1} \hat{S}(t_j)(t_{j+1} - t_j),$$

em que:

- $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ são os k tempos distintos e ordenados em que ocorreram falhas (morte de fêmeas);
- $\hat{S}(t)$ é o estimador de Kaplan-Meier.

3.3.5 Capacidade vetorial

A capacidade vetorial (V) foi estimada por meio da adaptação da fórmula proposta por REISEN (1989b) que considera:

$$V = \frac{m * a^2 * b * P^n}{-\ln P}$$

onde:

- m = densidade dos flebotomíneos em relação ao hospedeiro. Variável obtida por meio da captura de fêmeas de *Lu. cruzi* conforme metodologia descrita no item 3.2.3 (atratividade humana e canina aos flebotomíneos);

- a = proporção de fêmeas alimentadas durante o xenodiagnóstico dividido pela duração do ciclo gonotrófico (mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição das fêmeas mantidas em colônia);
- b = proporção de fêmeas que se infectaram após o xenodiagnóstico e que permitiram o desenvolvimento de formas infectantes do parasita;
- n = período de incubação extrínseco (tempo em dias entre o repasto sanguíneo e o aparecimento das formas metacíclicas do parasita, localizadas na parte anterior do tubo digestório médio, na região torácica logo após à válvula estomodeal); e
- P = probabilidade diária de sobrevivência: após o xenodiagnóstico, obtida a partir do seguimento diário das fêmeas, com observação no início da manhã, meio da tarde e início da noite para a obtenção curva de sobrevivência das fêmeas infectadas.

3.3.6 Infecção natural por *Leishmania* spp.

Fêmeas de flebotomíneos coletadas entre outubro de 2012 a março de 2014 foram submetidas à análise molecular para pesquisa de DNA de *Leishmania*. Os exemplares que não foram possíveis de identificar somente pela espermoteca foram clarificados e, junto com as fêmeas ingurgitadas, não foram incluídas nesta análise. Nos seis primeiros meses de análise (outubro/2012 a março/2013) as fêmeas foram agrupadas em pools de até dez insetos, de acordo com a espécie, local e data de coleta. As demais foram acondicionadas individualmente em microtubos de 1,5 mL com isopropanol e armazenadas sob refrigeração de -20 °C para serem submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

Além das fêmeas capturadas durante as coletas semanais regulares, uma amostra de 126 fêmeas foi capturada a parte e dissecada de acordo com JOHNSON et al. (1963). Estes exemplares foram capturados por aspiração em um galinheiro (mesmo local de coleta com armadilhas luminosas localizado no Bairro Maria Leite) durante três noites, das 19:00 às 21:00 h. Após expor o intestino e as espermotecas das fêmeas para a pesquisa de flagelados e identificação da espécie, respectivamente, o conteúdo da lamínula (tubo digestivo, tórax e cabeça) foi transferido e armazenado em microtubos de 1,5 mL com isopropanol a -20 °C para a

realização da PCR. Pools de até dez espécimes foram realizados para as fêmeas negativas ao exame direto para pesquisa de flagelados.

3.3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Para confirmar a infecção por *Leishmania*, todas as fêmeas utilizadas nos experimentos de infecção experimental pelo xenodiagnóstico foram submetidas à PCR.

O conteúdo da lamínula e do tubo digestivo dos espécimes foi triturado com auxílio de pistilo plástico em microtubos de 1,5 mL com 300 µL da solução de resina Chelex® (Bio-Rad, Hercules, USA) a 5%. A solução foi misturada em vortex por 15 seg e centrifugada por 60 seg a 13000 rpm. Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria a 80 °C por 30 min. Decorrido este tempo, os procedimentos de mistura em vortex e centrifugação foram repetidos para a posterior retirada e transferência do sobrenadante com DNA para outro microtubo estéril. O produto da extração foi acondicionado a – 20 °C.

A PCR foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pares de base (pb) de *Leishmania*. Para um volume final de 25 µL de reação foram adicionadas 5 µL de amostra, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 5,5 µL de água e 1 µL de cada oligonucleotídeo: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (EL TAI et al., 2000).

As condições de amplificação foram: 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 1 minuto, com pós-extensão a 72 °C por 5 min, em termociclador (BIOER, Hangzhou, CHN). Como controles negativos da reação foram utilizados uma reação sem DNA contendo água e DNA de fêmeas F₁ não alimentadas, e como controle positivo os DNA de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de cultura.

Os produtos da PCR obtidos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 1,5% em Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e submetidos à corrida eletroforética a 100 v por 100 min em tampão

TBE. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Os produtos das amostras positivas foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *HaeIII*, que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5', para identificar a espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al. 2003). Foi adicionado 1 µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima *Hae III*, 1 µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C 'overnight'. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por 3 h.

3.3.8 Competência vetorial

Na tentativa de demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* por meio da transmissão experimental de *Leishmania* sp., fêmeas F₁ obtidas de colônia mantida em laboratório foram utilizadas em experimentos de infecção experimental (xenodiagnóstico) em cães e em hamster infectados naturalmente com *Leishmania* (L.) *infantum* e experimentalmente com *Leishmania* (L.) *amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8).

Fêmeas selvagens capturadas conforme descrito no item 3.2.1 também foram utilizadas para a tentativa de demonstração da competência. Durante março de 2013 a dezembro de 2014 fêmeas selvagens de flebotomíneos foram capturadas para a manutenção de colônia de *Lu. cruzi* e para fornecer as fêmeas de primeira geração (F₁), que foram utilizadas nos experimentos de infecção experimental. Todos os hamsters utilizados para alimentar estas fêmeas foram acompanhados avaliar a suposta infecção por *Leishmania* transmitida naturalmente via picada.

Os animais expostos às picadas de insetos, infectados ou não, foram mantidos em segurança em rack ventilado equipado com mini-isoladores, em caixas próprias (gaiolas) com serragem autoclavada, ração e água *ad libidum*. Semanalmente, as gaiolas eram limpas e os animais examinados fisicamente quanto ao estado geral (emagrecimento, integridade da pele e alteração na pelagem). O seguimento máximo para avaliar a possível infecção por *Leishmania* foi de seis meses. Na presença de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*, este acompanhamento foi interrompido. Após este tempo, os hamsters foram submetidos

à eutanásia com dióxido de carbono e necropsiado para a retirada do baço e de fragmentos de pele, que foram utilizados para a confecção de esfregaços por aposição (*imprint*) corados com Giemsa, para a semeadura em meio de cultura e para a pesquisa de DNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes últimos foram transferidos para microtubos e mantidos sob refrigeração de – 20 °C.

3.3.9 Isolamento do parasito e análise molecular

Para o isolamento do parasito, os fragmentos obtidos a partir da necropsia foram semeados em meio artificial NNN (Mc Neal, Novy, Nicolle) com fase líquida de meio Schneider (*Schneider's Insect Medium*, Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab®) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma), mantidos a 25 °C em câmara de incubação biológica B.O.D. MA-414® (Marconi, São Paulo, BR). Para a pesquisa de formas promastigotas, as culturas foram examinadas semanalmente durante quatro semanas consecutivas a partir do sétimo dia de semeadura.

A análise molecular dos fragmentos e das culturas, quando positivas, foi realizada pela PCR e a identificação do parasito pela PCR-RFLP.

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o *Wizard DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR e RFLP foram realizadas conforme descrito no item 3.3.7.

3.4 DADOS AMBIENTAIS

3.4.1 Índices de cobertura vegetal e área de superfície impermeável

Como base cartográfica, foram utilizadas imagens GeoEye de 20 de agosto março de 2012, que são compatíveis com o ambiente urbano. As imagens adquiridas já estavam ortorreficadas e geometricamente corrigidas, com projeção e *datum* definidos. A projeção utilizada foi a *Universal Transverse Mercator* (UTM), hemisfério Sul, zona 21 e o *datum* WGS84.

Com o auxílio do software PCI Geomatica versão 9.1 (PCI GEOMATICS, 2003) foi realizada a combinação de bandas para a geração da imagem

multiespectral. A partir desta, foi realizada a correção atmosférica para então calcular os índices de vegetação e umidade por diferença normalizada, NDVI e NDWI, respectivamente, e a área de superfície impermeável (ISA) em torno dos pontos de coleta de flebotomíneos (*buffers* de 100 e 200 metros). A figura 5 esquematiza as etapas realizadas para a obtenção do NDVI, que foram as mesmas para o cálculo dos demais índices.

Figura 5 - Etapas de para o cálculo do NDVI a partir da correção atmosférica da imagem multiespectral (software PCI Geomatica).

Fonte: OLIVEIRA, 2011.

Os valores de NDVI são normalizados para o intervalo de -1 a +1 (PONZONI; SHIMABUKURO, 2007), sendo calculado pela seguinte relação:

$$NDVI = \frac{(NIR - R)}{(NIR + R)}$$

onde:

- *NIR* = reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo; e
- *R* = reflectância da vegetação na banda do vermelho.

As informações dos valores de NDVI para cada local de coleta foram estratificadas para a obtenção de variáveis de paisagem de diferentes escalas, como

a complexidade do hábitat (média de NDVI) e a heterogeneidade do hábitat (desvio padrão do NDVI – DP NDVI) (CORRÊA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

O NDWI também possui valores normalizados para o intervalo de -1 a +1 e foi calculado de acordo com o proposto por McFEETERS (1996):

$$NDWI = \frac{(GREEN - NIR)}{(GREEN + NIR)}$$

onde:

- *NIR* = reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo; e
- *GREEN* = reflectância da vegetação na banda do verde.

A área de superfície impermeável (ISA), também entendida como o grau de impermeabilização do solo foi calculado de acordo com CARLSON e ARTHUR (2000), que utiliza-se o cálculo do NDVI na equação:

$$ISA = \left[1 - \left(\frac{(NDVI - NDVI_0)}{(NDVI_s + NDVI_0)} \right)^2 \right]_{dev}$$

onde:

- $NDVI_0$ = representa os valores de NDVI para solo exposto; e
- $NDVI_s$ = representa os valores de NDVI para vegetação densa.

O termo *dev* indica que a fórmula é apropriada somente para regiões classificadas como urbanas. Neste caso, quanto mais próximo do número um, mais impermeável será uma superfície avaliada.

Os percentuais de cobertura vegetal foram estimados com auxílio de um densiômetro esférico. Este aparelho trata-se de um espelho convexo quadriculado com 36 vértices no qual são contados os vértices que refletem a cobertura da vegetação lenhosa sob quatro perspectivas diferentes (norte, sul, leste e oeste), sendo cada observação com uma rotação de 90° em relação à anterior para cada ponto. Foi calculada a média aritmética dos valores das quatro observações para então obter o percentual de cobertura vegetal com uma regra de três simples. Em cada local de coleta foram realizadas cinco medições em distribuições aleatórias no entorno no ponto.

3.4.2 Variáveis meteorológicas

Os dados climáticos referentes ao período de estudo foram extraídos do banco de dados Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul (Cemtec) que é vinculado ao Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet).

Foram obtidos os valores das aferições diárias de cada variável meteorológica utilizada neste estudo (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, velocidade do vento).

3.4.3 Análise estatística

O total de espécimes coletados e as três espécies mais abundantes foram avaliados pela média mensal geométrica de Williams (HADDOW, 1954, 1960) e também pela média mensal aritmética, uma vez que ambas são medidas de tendência central e refletem a frequência das espécies por coletas, bem como a regularidade nas mesmas. As demais medidas descritas (desvio padrão, mediana, valores máximo e mínimo) também foram calculadas.

A proporção do total de espécimes e das três espécies mais abundantes, considerado a divisão por sexo, entre os locais de coleta foi comparada com o teste de Kruskal-Wallis e o p -valor foi utilizado para testar a hipótese de igualdade.

As comparações das frequências absolutas do total de flebotomíneos e das três espécies mais abundantes entre os sexos e as estações climáticas (seca e chuvosa) foram feitas utilizando-se o teste de Wilcoxon.

O grau de associação entre as variáveis meteorológicas e o número de exemplares de flebotomíneos foi avaliado pelo coeficiente de correlação de Spearman. A mesma análise foi empregada para as correlações entre número de espécimes e as demais variáveis ambientais avaliadas (vegetação e área impermeável).

Em todos os casos, o valor de p usado para demonstrar a significância estatística foi de 0,05. As análises foram conduzidas no software R versão 3.1.2 (R CORE TEAM, 2014).

3.5 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Uso Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) sob o protocolo n°. 491/2013 (ANEXO A) e o grupo de estudo possui a Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico, emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: SISBio 25952-1).

Conforme mencionado, os flebotomíneos foram mantidos em local adequado e protegido contra a fuga. Após a alimentação em cães infectados por *L. (L.) infantum*, os insetos foram mantidos em gaiolas em uma área de isolamento e os cães, após a exposição às fêmeas, foram submetidos à eutanásia conforme a rotina do serviço (CCZ de Campo Grande, MS) e recomendação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006a). O alojamento, a alimentação, bem como as condições de conforto e higiene dos cães utilizados neste estudo foram de responsabilidade do CCZ.

Os hamsters expostos a picadas de insetos, infectados ou não, foram mantidos em segurança em rack ventilado equipado com mini-isoladores, em caixas próprias com serralha autoclavada, ração e água *ad libitum*. A limpeza das gaiolas será realizada semanalmente. Após o término dos experimentos, os hamsters serão submetidos à eutanásia com dióxido de carbono e o descarte será feito segundo as normas de biossegurança preconizadas pela UFMS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ARTIGO 1:

Alternative method for the mass rearing of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) in a laboratory setting

E. F. Oliveira¹, W. S. Fernandes², E. T. Oshiro², A. G. Oliveira², and E. A. B. Galati³

Em avaliação no periódico *Journal of Medical Entomology*.

Abstract

The understanding of the transmission dynamics of *Leishmania* spp. Ross as well as the epidemiology and spread of leishmaniasis is related to parasite-vector-host interactions, which can be studied using specimens of a sandfly population reared in the laboratory, exposing individuals to experimental infection for the investigation of vector competence and parameters of the vectorial capacity of the species. The present study sought to describe an alternative method for the implantation of a *Lu. cruzi* colony with wild specimens captured in the municipality of Corumbá, Brazil. With Method 1, gorged females were individualized for oviposition. The eggs were transferred to an acrylic Petri dish with a layer of plaster on the bottom, on which food was placed after hatching of the first larvae. With Method 2, females were kept in groups for oviposition in flasks, in which soil and food were placed on their bottom for the larvae. In addition the exposure time of the larvae to light was reduced in comparison to Method 1. With Method 2, a significantly greater number of specimens of *Lu. cruzi* was obtained. The ratio between the number of emerged adults and the females followed for oviposition was 0.42 with Method 1 and 2.75 with Method 2. The optimization of the rearing conditions for *Lu. cruzi* will enable us the establishment of a colony providing a sufficient number of specimens to develop experimental

¹Postgraduate Program in Public Health, School of Public Health, University of São Paulo – USP, Av. Dr. Arnaldo, 715 – São Paulo, SP, BRA 01246-904.

²Center for Biological and Health Sciences, Laboratory of Parasitology, Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Cidade Universitária, s/n, Campo Grande, MS, BRA 79090-900.

³Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo – USP, Av. Dr. Arnaldo, 715 – São Paulo, SP, BRA 01246-904.

infection by *Leishmania* as well as vectorial competence and some parameters of the vectorial capacity of this sandfly.

Keywords: *Lutzomyia cruzi*, rearing, sandfly, colony.

Sandflies are natural vectors of the protozoan *Leishmania* spp. Ross and also may transmit other pathogenic agents to humans and animals (Sherlock 2003). Among the types of leishmaniasis, the visceral form is the most severe and has expanded geographically throughout the world. The migration of rural populations to the periphery of urban centers, deforestation and environmental changes have contributed to the geographical spread of this disease (Desjeux 2001, Maia-Elkhoury *et al.* 2008). Data from the World Health Organization indicate that the disease had been notified in 81 countries by 2013 and is endemic in 74 of these countries, with estimates of 0.2 to 0.4 million of new cases of visceral leishmaniasis each year worldwide (WHO, 2014). In Brazil, 22,642 cases were notified between 2007 and 2012 and the Northeastern region of the country accounted for approximately 59% of the notifications in this period (BRASIL, 2014).

In the Americas, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) is the main vector of the etiological agent of visceral leishmaniasis (Deane and Grimaldi 1985). Moreover, *Pintomyia evansi* (Nuñez-Tovar) has been incriminated as an important vector in Colombia (Travi *et al.* 1994) and as an alternative vector in Venezuela (Feliciangeli *et al.* 1999). In the Brazilian Pantanal wetland, in Corumbá city, where *Lu. longipalpis* was not found, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) and *Lutzomyia forattinii* Galati, Rego Jr., Nunes & Oshiro have been suspected of acting in the transmission of *Leishmania infantum* based on ecological evidence (Galati *et al.* 1997) as well as the detection of natural infection by *L. infantum* through dissection (Santos *et al.* 1998) and molecular biological methods (Pita-Pereira *et al.*, 2008).

Understanding the dynamics of the transmission of *Leishmania* spp. as well as the epidemiology and expansion of leishmaniasis and, consequently, the planning and implementation of disease control measures should involve aspects inherent to parasite-vector and vector-vertebrate interactions, which can be studied through the laboratory rearing of sandflies for the investigation of experimental infection, vectorial competence and vectorial capacity (Volf and Volfova 2011). Moreover, the maintenance of sandfly colonies is indispensable to genetic, physiological and

behavioral studies (Endris *et al.* 1982). Although more than 900 species of sandflies are known (Galati 2014), less than 50 have been colonized in laboratory settings and only a few have been successfully reared continuously to provide enough specimens for experimental studies (Volf and Volfova 2011, Brazil & Brazil 2003, Killick-Kendrick 1991).

The establishment of a sandfly colony is of considerable importance, as this group of insects is of interest to public health. With rearing in the laboratory, studies on reproductive biology, morphological characteristics, behavior and parasite-vector-host interactions can be performed (Killick-Kendrick *et al.* 1977, Killick-Kendrick 1978). Thus, rearing has been performed in laboratory with different purposes, given the difficulty of finding natural sandfly breedings, which has hindered knowledge on the biology of many species (Brazil and Brazil 2003).

Despite the existence of a basic experimental rearing method for sandflies (Killick-Kendrick 1977, Rangel *et al.* 1986, Modi and Tesh 1983), a number of researchers have stressed the difficulty in establishing sandfly colonies (Killick-Kendrick 1978, Killick-Kendrick and Killick-Kendrick, 1991), demonstrating the need for adaptations to obtain the successful maintenance of different colonies. Thus, the aim of the present study was to describe an alternative method for the mass rearing of *Lu. cruzi* and the establishment of a colony in a laboratory setting.

Materials and Methods

Capture of sandflies

Sandflies were captured in the municipality of Corumbá (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" W; 118 m above sea level), located in the northeastern of Mato Grosso do Sul state (central western Brazil) between September 2013 and April 2014. Collections were performed with electric aspirator (NATAL; MARUCCI 1984) between 6 and 10:30 pm in and around a chicken coop located near the residence of a small ranch in urban area (18°59'44" S; 57°19'36" W). The insects were kept in cages with a metal frame and nylon mesh (30 x 30 cm), which were enveloped in moistened towels to maintain humidity. Apple slices were placed in the cages as a food source.

Rearing method

Two rearing methods were performed. Method 1 followed the protocols proposed by Killick-Kendrick *et al.* (1977) and Rangel *et al.* (1986), as follows:

Male and female adults captured in the field were transported to the Parasitology Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Brazil), approximately 450 km from the collection site. In the laboratory, males and females were kept in nylon mesh cages for mating. Blood feeding of the females occurred during one hour on a healthy hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) anesthetized with xylazine and ketamine at a dose adjusted by weight. During feeding, the cage was covered with a dark fabric. Forty-eight hours after feeding, the females were placed individually in polyethylene vials (2.5 cm diameter x 3.5 cm) with plaster on the bottom and a mesh lid to allow the circulation of air. After oviposition, the eggs were transferred with the aid of a thin brush or distilled water to acrylic Petri dishes (6.2 cm diameter x 2.2 cm) lined with plaster. The dishes were kept in polystyrene foam cases lined with plaster, which was moistened. The cases were placed in a B.O.D. incubator with a temperature varying between 26 and 28 °C, relative humidity from 80 to 85% and a 6 h/18 h light/dark photoperiod. Small amounts of dehydrated, powdered bovine liver (Oxoid®) were added to the Petri dishes by aspersion as food when the first larvae (L1) were observed. On a daily basis, the dishes were examined for the larval count, recording of stages, addition of food and moistening of the plaster (when necessary) as well as the detection of fungi and mites, which were removed. This individualization of females for oviposition was maintained until December. However, modifications were deemed necessary due to the low oviposition rate, which led to the method described below.

Method 2 involved the blood feeding of the females on a hamster immediately following the end of the collection period (between 11 pm and 12 am) under the same conditions described in Method 1. The following morning, approximately 8 to 10 hours after feeding, males and females were grouped in larger plastic flasks (12.0 x 8.0 x 9.5 cm) lined with plaster on the bottom, with a mesh lid to allow the circulation of air and having a cannula (diameter of 1 cm) to put the adults inside (Fig. 1). Ten to 15 females and five to 10 males were put into the flask with the aid of a Castro's capturator. Prior to transference of the specimens, each flask was moistened with up to 3.0 mL of water and a small amount of soil (approximately 1.5

g) from the collection site was added. Apple slices were placed at the mesh opening of the lid as a source of food and water. The flasks were kept in a polystyrene foam case lined with plaster and covered with a moistened towel until oviposition. The towel was moistened and the apple slices were exchanged daily.

After oviposition, the dead insects were removed for identification and the eggs counted, except for dead females with eggs adhered to their bodies. The exact number of eggs was not possible to count, because ovipositions were performed on dark soil. After the removal of the dead adults, enough soil was added to cover the eggs (approximately 26.5 g), which corresponded to 0.5 cm of soil over the plaster layer on the bottom of the flask. The mesh lid used for the circulation of air and placement of the apple slices was covered with craft paper and sealed with adhesive tape. The flasks were kept in the same polystyrene foam case, which was placed in a B.O.D. incubator with a temperature of 26 to 28.5 °C and relative humidity of 80 to 85%. Small amounts of dehydrated, powdered bovine liver (Oxoid®) were added inside the Petri dishes by aspersion as food when the first larvae (L1) were observed. Unlike what occurred with Method 1, the flasks were examined every two or three days to record the stages, add food and moisten the soil, when necessary. The amount of food offered periodically depended on the density of the larvae and consumption. On days when the flasks were examined, the photoperiod was 20 min/23 h 40 min (L/D). The remaining days the recipients remained in the dark for 24 hours. After the observation of the first pupa, the flasks were examined daily to removal the adults emerged.

The duration of the biological cycle per larval instar could not be evaluated with Method 2 due to the difficulty in counting and observing all the larvae in each flask, which were hidden under the soil, especially in the presence of direct artificial light, and the fact that the recipients were only examined every two to three days. Therefore, the minimum duration of the cycle was determined from the observation of the first hatched larva (L1), the first pupa and the first adult emerged.

The soil used in this method was previously kept in a hothouse at 60 °C for three hours in a hermetically sealed recipient to preserve the natural moisture. Chemical analysis was performed using the Mehlich extraction method for the determination of macronutrients and micronutrients. This analysis was conducted at the Soil Fertility Laboratory of the State of Mato Grosso do Sul Animal and Vegetal Sanitary Defense Agency (IAGRO/MS).

The plaster used to line all the recipients (individualized vials, larger flasks and polystyrene foam case) was the cream type (98.4% $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$).

A statistical test was used to compare and determine the significance of mean differences between the two methods to the 95% significance level, considering the number of wild females used and the number of adults obtained. The R software program, version 3.1.0 (R Core Team 2014) was used for the statistical analysis.

This study received approval from the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Brazil) under process number CEUA-491/2013. The research group retains a permanent license for the collection of zoological material granted by the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources – IBAMA (SISBio 25952-1).

Results

Successful mass rearing of *Lutzomyia cruzi* in the laboratory was achieved with Method 2. Table 1 displays the number of females followed for oviposition, eggs, emerged adults and minimum duration of the life cycle with the two rearing methods. A greater number of adults were obtained using Method 2. The ratio between the number of emerged adults and females followed for oviposition was 0.42 with Method 1 and 2.75 with Method 2, which demonstrates the greater effectiveness of the second method. The mean difference test was statistically significant ($Z = -14.23$; $P < 0.001$). With Method 2, a three-day reduction occurred in the minimum life cycle, which was the time in days between oviposition and the emergence of the first adult. A total of 55.8% and 48.8% of the emerged adults were female with Method 1 and Method 2, respectively. With both methods, males emerged before females.

Table 2 displays the minimum duration of the life cycle and number of emerged adults for three different temperatures using Method 2. Mean duration from the emergence of the first instar larva (L1) to the emergence of the first adult was 27.3 days, considering all temperatures. The minimum cycle at 27 °C was slightly shorter in comparison to the other temperatures.

Considerable contamination and growth of fungi and a large number of mites were found with Method 1, in which only powdered liver was added into the Petri dishes. This fact reduced the viability of larvae hatching, especially those of first and second instars (L1 and L2), resulting in few emerged adults. However, a

considerable reduction in fungi and mites occurred with Method 2, in which soil was used as the substrate and a source of nutrients for the larvae.

As mentioned above, the soil used in Method 2 was from the site where the wild sandflies were captured. This area contains litholic neosol and argiluvic chernosol soils. The pH of the collected sample was 6.70. Table 3 displays the macronutrients and micronutrients determined by the chemical analysis. The high quantities of organic matter and all essential chemical elements demonstrate the adequate fertility of the soil.

Discussion

There are no data on susceptibility to *Leishmania* for most sandfly species (Volf and Volfova 2011) and many species have been incriminated as vectors based on ecological/epidemiological evidence (abundance as well as spatial and temporal distribution of species coinciding with cases of the disease) or the detection of natural infection by *Leishmania*, as occurred for *Lu. cruzi* (Pita-Pereira *et al.* 2008, Santos *et al.* 1999, Galati *et al.* 1997). Thus, mass rearing and the establishment a colony are essential to studies aimed at understanding the transmission dynamics of *Leishmania* through experimental infection (Killick-Kendrick 1978, Volf and Volfova 2011).

The present findings demonstrate that adaptations and alterations to the basic experimental sandfly rearing method (Killick-Kendrick *et al.* 1977, Rangel *et al.* 1986, Modi and Tesh 1983) allowed the mass cultivation of *Lu. cruzi* in a laboratory setting. Such modifications included the use of soil from the site where the wild specimens were captured as substrate for oviposition as well as a source of nutrients for the larvae and the reduction in exposure to light of the rearing recipients, with a photoperiod of 20 min/23 h 40 min (L/D). Although Method 2 (grouping of various females for oviposition) achieved good results, the individualization of engorged females, albeit time consuming and labor intensive, should be performed whenever the first laboratory generation of a given species is reared, whether for the adequate separation of the eggs by species or for creation of a life table (Volf and Volfova 2011).

Although it was not possible to count the number of eggs with Method 2, the total number of emerged adults suggests that the oviposition rate was higher in

comparison to Method 1. Mann and Kaufman (2010) colonized *Psathyromyia shannoni* (Dyar) and also reported an increase in the oviposition rate directly influenced by cohabitation density with the grouping of specimens. The authors suggest that this effect may stem from the presence of specific pheromones that stimulate oviposition or a cumulative effect when the density of specimens per recipient is increased. Further studies are needed to draw more concrete conclusions on this matter. Another factor was the presence of soil in the recipients in the present experiment, which may have served as a sensory stimulus, thereby contributing to the increase in oviposition rate.

The high mortality rate of engorged females before, during and after oviposition and the consequent low oviposition rate was one of the main drawbacks encountered during the rearing of *Lu. cruzi* with Method 1 (individualized females). Moreover, contamination by fungi and mites in the rearing dishes may have also contributed to the lower degree of success. These difficulties have also been reported during rearing and establishing of colonies for other species of sandfly. Killick-Kendrick (1978), Killick-Kendrick and Killick-Kendrick (1991) and Maroli *et al.* (1987) also report that a high female mortality rate after oviposition was one of the main difficulties. Under experimental conditions, this is a common phenomenon and females generally die from exhaustion after the first oviposition (Maroli 1987, Alarcón-Elbal *et al.* 2011).

Contamination by fungi and mite is commonly reported. Marchais *et al.* (1991) describe the main problems related to the rearing of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and suggest that the solution for the fungal contamination of rearing recipients resides in the use of aseptic methods and the prevention of over-feeding. Rangel *et al.* (1985) mention the proliferation of fungi as one of the causes that contributed to the loss of larvae in the first two instars (L1 and L2), which is in agreement with the findings of the present study, in which greater mortality in the first larval instar occurred due to fungal contamination using Method 1. However, a considerable reduction in fungi and mites was found with Method 2, even in recipients where some females were not removed after death due to the presence of eggs adhered to their bodies. Alarcón-Elbal *et al.* (2011) cite the maintenance of dead sandfly bodies as the main cause of fungal contamination in the rearing recipient, together with the excess of food for the larvae. It is believed that the addition of soil as substrate and a source of nutrients, combined with the intensive

activity and movement of larvae in the soil, favored the reduction in fungi and mites in the present study.

The option of using soil as substrate and a source of nutrients for the larvae was based on the fact that immature forms develop in breedings having moist soils rich in organic matter and shielded from direct sunlight, between exposed roots, in tree trunks, under fallen leaves, under rocks, in crevices in rocks, in animal dens and in human-constructed facilities, such as pig pens, chicken coops, kennels and stables, or other ecotopes with favorable conditions for survival (Aguiar and Medeiros 2003, Forattini 1973).

The soil was collected from a chicken coop where the wild specimens of *Lu. cruzi* were captured. Prior its use, the soil was placed in a hothouse at 60 °C for three hours to eliminate possible organisms that could compete with or prey on the sandfly larvae. The chemical analysis demonstrated that the soil had a large amount of organic matter and essential chemical elements. Besides the physicochemical properties of the soil from the study area, which are inherent to the type of rock and pedogenic processes that formed it, there was also the presence of chicken waste, which possibly modified the chemical composition. Chicken waste is made up of complex substrates containing particulate and dissolved organic matter, such as polysaccharides, lipids, proteins and volatile fatty acids, as well as a large amount of inorganic components, such as nitrogen, phosphorus and potassium (Steil *et al.* 2002).

The larvae also received dehydrated, powdered liver as a food source throughout all larval instars. Chaniotis (1975) used powdered liver as food for the larvae of *Nyssomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig) and found that the life cycle was accelerated and more synchronized than when lettuce was used. Gemetchu (1971) fed the larvae of *Phlebotomus longipes* Parrot & Martin with powdered liver and found that this diet was better than a diet based on rabbit feces. Rangel *et al.* (1986) used aquarium fish food and boiled lettuce (dried and ground) to feed the larvae of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Lu. longipalpis* with good acceptance by both species. According to Souza *et al.* (1999), larval diet is important to the successful colonization of sandflies, as an inadequate diet can lead to excessive larval mortality.

The photoperiod is an important factor during the rearing of sandflies, as light intensity increases the duration of the cycle. According to Barretto (1942), the cycle is

more regular in the absence of light. Indeed, the present findings demonstrate that the reduction in the exposure of the larvae to light with Method 2 reduced the minimum life cycle in comparison to Method 1, in which the photoperiod was 12 hours of light and dark. Studying the chronobiology of *Lu. longipalpis*, Rivas *et al.* (2014) demonstrated the effects of photoperiod and temperature on the circadian rhythm and daily activity of adult specimens under laboratory conditions, suggesting that the species exhibits a behavioral response to these variables.

With both rearing methods, males emerged before females. With Method 1, a greater percentage of females emerged, whereas males were more prevalent with Method 2. Studying *Ny. intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Pinto) colonized in a laboratory at temperatures of 25 to 26 °C with the individualization of females for oviposition, Andrade Filho *et al.* (2004) also found that males emerged first, whereas females accounted for a greater percentage of the adults of both species.

The minimum duration of the complete life cycle of *Lu. cruzi* under laboratory conditions was 30 days with Method 1 and 27 days with Method 2, using the same temperature and humidity, Brazil (2002) report a mean life cycle of 37 days for *Lu. cruzi* (minimum: 31 days; maximum: 56 days) at temperatures of 25 to 26 °C. For *Lu. longipalpis*, which is a sibling species of *Lu. cruzi*, Rangel *et al.* (1987) report a mean life cycle of 35 days at temperatures of 25 ± 1 °C and 33 days when the temperature ranged from 26 to 30 °C, whereas Brazil *et al.* (1997) describe a cycle of 29.5 days at temperatures of 26 to 28 °C.

The possibility of the laboratory rearing of *Lu. cruzi*, which is one of the vectors of *L. infantum*, with the production of a sufficient number of females can contribute to the development of experiments aimed at obtaining information on parasite-vector-host relationships necessary to the investigation of its vectorial capacity.

Acknowledgments

We are grateful to Letícia M. Ribeiro, Aline E. Casaril and Nathália L. F. Mateus for their technical assistance and help during capture of sandflies. This research was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2011/23414-0) and the Foundation for Development Support of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT/DECIT-MS/CNPq/SES N° 04/2013 – PPSUS-MS – 23/200.537/2013).

References Cited

- Aguiar, G. M., and W. M. Medeiros. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, pp. 207-255. *In* E. F. Rangel and R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Alarcón-Elbal, P. M., B. G. Montoliu, R. Pinal, S. Delacour-Estrella, I. Ruiz-Arrondo, M. Á. Peribáñez, I. De Blas, R. Molina, J. A. Castillo, L. Diéguez-Fernández, and J. Lucientes. 2011. How to increase the population of a *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) colony: a new method. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 106: 731-4.
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. den Boer. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671.
- Andrade Filho, J. D.; E. A. B. Galati, and A. L. Falcão. 2004. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 597-601.
- Barretto, M. P. 1942. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera: Psychodidae). Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- (BRASIL) Ministério da Saúde do Brasil. 2014. Leishmaniose Visceral - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Brasília, DF, Brasil.
- Brazil, B. G., P. M. F. Teixeira, C. S. Leal, and R. P. Brazil. 2002. Biology of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (Mangabeira, 1938), in a laboratory colony. *Entomol. vectores* 9: 64-65.
- Brazil, R. P., V. L. Carneiro, J. D. Andrade-Filho, J. C. M. Alves, and A. L. Falcão. 1997. Biology of *Lutzomyia lentii* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 26: 191-193.
- Brazil, R. P., and B. G. Brazil. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais, pp. 257-274. *In* E. F. Rangel and R. Lainson (eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Chaniotis, B. N. 1975. A new method for rearing *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with observations on its development and behavior in the laboratory. *J. Med. Ent.* 12: 183-188.
- Deane, L. M., and G. Grimaldi. 1985. Leishmaniasis in Brazil, pp. 247-281. *In* K. P. Chang and R. S. Bray (eds.), *Leishmaniasis*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Endris, R. G., P. V. Perkins, D. G. Young, and R. N. Johnson. 1982. Techniques for laboratory rearing of sandflies (Diptera: Psychodidae). *Mosq News* 42: 400-407

- Feliciangeli, M. D., N. Rodriguez, Z. Guglielmo, and A. Rodriguez. 1999. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite*. 6: 113-120.
- Forattini, O. P. 1973. *Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae, leishmanioses, bartonelose*, 4th ed. Edgard Blücher, São Paulo, SP, Brasil.
- Galati, E. A. B., V. L. B. Nunes, F. A. Rego Jr, E. T. Oshiro, and M. R. Chang. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saude Publica*. 31: 378-390.
- Galati, E. A. B. 2014. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. (http://www.fsp.usp.br/egalati/ApostilaPhlebotominae_2014_vol_I.pdf).
- Gemetchu. T. 1971. Liver and yeast as larval diets in colonization of a sandfly (*Phlebotomus longipes*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 682-684.
- Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, and P. D. Ready. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 13: 429-440.
- Killick-Kendrick, R. 1978. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. *Acta Trop.* 35: 297-313.
- Killick-Kendrick, R., M. Maroli, and M. Killick-Kendrick. 1991. Bibliography on the colonization of Phlebotomine sandflies. *Parassitologia* 33: 321-333.
- Mann R. S., and P. E. Kaufman. 2010. Colonization of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) utilizing an artificial blood feeding technique. *J. Vector. Ecol.* 35: 286-94.
- Marchais, R., F. Bouchet, and P. Bouchet. 1991. Laboratory rearing of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) and fungal growth problems. *Parassitologia* 33: 393-397.
- Maroli, M., S. Florentino, and E. Guandalini. 1987. Biology of a laboratory colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 24: 547-551.
- Modi, G. B., and R. B. Tesh. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20: 568-9.
- Natal, D., and D. Marucci. 1984. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev. Saude Publica*. 18: 418-420.
- Pita-Pereira, D., M. A. B. Cardoso, C. R. Alves, R. P. Brazil, and C. Britto. 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.* 107: 66-69.

R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rangel, E. F., N. A. Souza, E. D. Wermelinger, and A. F. Barbosa. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80: 219-226.

Rangel, E. F., N. A. Souza, E. D. Wermelinger, A. F. Barbosa, and C. A. Andrade. 1986. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81: 431-438.

Rangel, E. F., N. A. Souza, E. D. Wermelinger, and A. F. Barbosa. 1987. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. II. Influência de fatores ambientais no comportamento das formas imaturas e adultas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82: 385-394.

Rivas, G. B. S., N. A. Souza, A. A. Peixoto., and R. V Bruno. 2014. Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Parasit. Vectors 7: 278.

Santos, S. O., J. Arias, A. A. Ribeiro, M. P. Hoffmann, R. A. Freitas, and M. A. F. Malacco. 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 12: 315-317.

Sherlock, I. A. 2003. Importância médico-veterinária, pp.15-19. In E. F. Rangel and R. Lainson (eds.), Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Souza, R. N., J. W. O. Lima, F. V. Souza, A. C. Gadelha, and V. S. S. Braga. 1999. Estabelecimento de um criadouro natural de *Lutzomyia longipalpis*, pp. 214-215. In Proceedings XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 28 February – 4 March 1999, Vitória, ES. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, Brasil.

Steil, L., J. Lucas Jr., and R. A. Oliveira. 2002. Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos. Eng. Agríc. 22: 146-159.

Travi, B. L., C. Jaramillo, J. Montoya, I. Segura, A. Zea, A. Goncalves, and I. D. Velez. 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 557-565.

Volf, P., and V. Volfova. 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. J. Vector Ecol. 36: S1-S9.

WHO. World Health Organization. 2014. Global Health Observatory Data Repository: leishmaniasis. WHO, Geneva, Switzerland.

Table 1. Number of females captured, eggs, adults emerged and minimum life cycle according to rearing method.

	Method 1 (individualized females)	Method 2 (grouped females)
Number of females followed for oviposition	182	1,073
Number of eggs	118	-
Mean number of eggs per female	0.65	-
Number of emerged adults (male; female)	77 (34; 43)	2,947 (1,506; 1,441)
Minimum duration of life cycle (days)*	30	27
Ratio between emerged males/females and females followed	0.18; 0.24	1.40; 1.34

* Time in days between oviposition and emergence of first adult.

Table 2. Number of females followed for oviposition, minimum duration of life cycle and number of emerged adults using Method 2 according to rearing temperature.

	26 – 28 °C	27 °C	28.5 °C
Number of females followed	416	541	116
Time between blood feeding time and oviposition (days)	6	7	6
Time between oviposition and L1 (days)	7	5	7
Time between L1 and emergence of adult (days)	23	20	20
Total number of adults (male; female)	1,207 (618; 589)	1,462 (746; 716)	278 (142; 136)
Ratio between emerged adults/females and females followed	2.90 (1.49; 1.41)	2.70 (1.38; 1.32)	2.40 (1.22; 1.17)

Table 3. Chemical analysis of macronutrients and micronutrients in soil used in Method 2.

Macronutrients	Values
P (mg/dm ³)	1620.00
MO (g/kg)	>5.00
K (cmolc/dm ³)	3.07
Ca (cmolc/dm ³)	17.10
Mg (cmolc/dm ³)	4.41
Al (cmolc/dm ³)	0.00
H+Al (cmolc/dm ³)	2.00
S ¹ (cmolc/dm ³)	24.50
T ² (cmolc/dm ³)	26.50
Micronutrients	
Fe (mg/dm ³)	5.99
Mn (mg/dm ³)	42.36
Cu (mg/dm ³)	0.49
Zn (mg/dm ³)	20.21

¹S = sum of bases (Ca + Mg+ K)

²T = CTC at pH 7.0 [S + (H+ Al)]

Fig. 1. Flask for oviposition and culture of larvae and pupae. (a and b) Side view of flask and mesh lid, respectively. (c and d) Top view of the flask and mesh lid, respectively.

4.2 ARTIGO 2:

Infecção experimental de *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania*: estimativa e parâmetros da capacidade vetorial

E. F. Oliveira, E. T. Oshiro, W. S. Fernandes, P. G. Murat, M. J. Medeiros, A. G. Oliveira, E. A. B. Galati

Artigo a ser submetido à publicação.

RESUMO

O encontro de flebotomíneos infectados naturalmente por *Leishmania* Ross, 1903 demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados para verificar a importância de determinada espécie na transmissão do parasito. Para que um inseto seja considerado vetor de *Leishmania* alguns parâmetros devem ser considerados, como a competência vetorial e a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana, o grau de relacionamento com os reservatórios e com o homem, a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito, bem como a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório. Este trabalho tem por objetivo avaliar estes parâmetros e estimar a capacidade vetorial de *Lutzomyia cruzi* para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. Experimentos de infecção experimental (xenodiagnóstico em cães com infecção comprovada por *Leishmania* e em hamster infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*) e coletas de flebotomíneos selvagens em hospedeiros (cães) foram realizados para a avaliação e estimativa dos parâmetros estudados. A proporção média de fêmeas alimentadas nos hospedeiros avaliados foi de 0,40. A taxa de infecção experimental de *Lu. cruzi* para *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* foi de 10,55 e 41,56%, respectivamente. Os experimentos de atratividade demonstraram que *Lu. cruzi* apresenta elevada atratividade tanto para cão, quanto para homem. A capacidade vetorial estimada foi de 0,24, sugerindo que a população de fêmeas da área produzam 0,24 novas infecções por dia de exposição à fonte de infecção. Estes resultados descrevem pela primeira vez aspectos relacionados à interação vetor-

parasita envolvendo *Lu. cruzi* e reafirmam a necessidade de outros estudos envolvendo a espécie.

INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* Ross, 1903 apresenta um grupo importante de parasitas que são agentes etiológicos de um complexo de doenças denominado leishmanioses (WHO, 2010), que estão entre as principais doenças negligenciadas no mundo (ALVAR et al., 2012). Embora muitos aspectos epidemiológicos e clínicos das leishmanioses sejam conhecidos (GONTIJO e MELO, 2004; GUERIN et al., 2002; READY, 2014; ROMERO; BOELAERT, 2010), bem como o papel dos flebotomíneos na transmissão de várias espécies de *Leishmania* (GALATI et al., 1997, 2003; LAINSON e RANGEL, 2005), a capacidade e a competência vetorial de insetos suspeitos ou comprovados têm sido pouco avaliadas (CASANOVA et al., 2009).

A capacidade vetorial de um inseto hematófago pode ser definida como o número esperado de picadas infectivas que eventualmente surgiria do total de mosquitos que picassem uma única fonte de infecção em um único dia (SMITH et al., 2012). Os modelos iniciais propostos para estimar a capacidade vetorial foram desenvolvidos para populações de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, a partir de estudos para o controle de malária, quando GARRET-JONES (1964) e REISEN (1989) desenvolveram um modelo que considerava para o vetor a densidade em relação ao hospedeiro, a atratividade ao hospedeiro, a proporção de fêmeas que exerciam a hematofagia neste hospedeiro, a probabilidade de sobrevivência estimada em campo, a duração do ciclo gonotrófico, a duração do período de incubação extrínseco e a proporção de fêmeas infectadas com formas infectantes.

A incriminação de uma espécie de flebotomíneo como vetor de *Leishmania* deve obedecer alguns critérios que foram inicialmente propostos por KILLICK-KENDRICK (1990) e revisados por READY (2013), entre os quais se destacam (1) o encontro de fêmeas selvagens naturalmente infectadas por *Leishmania* e o isolamento de formas promastigotas em fêmeas não alimentadas recentemente, (2) a competência vetorial e a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana, (3) o grau de relacionamento com os reservatórios e com o homem, (4) a densidade e a taxa de infecção natural pelo

parasito, (5) a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório e, mais recentemente, a modelagem matemática para demonstrar a influência da abundância vetorial sobre a incidência da doença.

Frequentes encontros de flebotomíneos naturalmente infectados por determinada espécie de *Leishmania*, exceto se vetor comprovado, têm levado os estudiosos a encaixá-los no conceito de vetores permissivos, reafirmando a necessidade de investigação de outras espécies com potencial para atuarem na transmissão desse agente, principalmente em áreas com casos autóctones de leishmaniose visceral (LV) sem que o vetor comprovado, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), tenha sido encontrado, como nos municípios de Corumbá, Ladário e Jaciara, da região Centro-Oeste do Brasil (BRITO et al., 2014; CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1997; SANTOS et al. 1998; MISSAWA et al., 2006).

Estudos com espécies vetorais ou suspeitas de participarem da transmissão do parasito são necessários para compreender as complexas interações que ocorrem na tríade *Leishmania*-vetor-hospedeiro vertebrado e suportam o início e persistência da infecção (SECONDINO et al., 2012). Adicionalmente, essas informações são fundamentais para o conhecimento da disseminação da LV e para o planejamento das medidas de controle vetorial, uma vez que as ações preconizadas pelos órgãos de saúde centram-se no controle de *Lu. longipalpis*.

Portanto, este estudo tem por objetivo avaliar parâmetros envolvidos na interação parasito-vetor e, conseqüentemente, na capacidade vetorial de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) apontada como um possível vetor do agente da LV em Corumbá e Ladário (GALATI et al., 1997; PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estabelecimento de colônia e obtenção de adultos de primeira geração (F₁), espécimes selvagens de *Lu. cruzi* foram coletados no perímetro urbano do Município de Corumbá (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" O; 118 m. a. n. m), que está localizado na porção noroeste do Estado de Mato Grosso do Sul, região do Pantanal Sul-mato-grossense, e faz fronteira com a Bolívia (Figura 1). O município possui área total estimada de 64.962,8 km², o que representa 18,19% da extensão

territorial do Estado. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2014 a população total estimada era de 108.010 habitantes, com densidade demográfica de 1.60 (hab/km²), sendo que 90% residem no perímetro urbano da cidade (IBGE, 2014).

Estabelecimento de colônia de flebotomíneos

A coleta de flebotomíneos foi realizada manualmente com auxílio de aspiradores elétricos de sucção (NATAL; MARUCCI, 1984), dentro e nos arredores do galinheiro localizado no peridomicílio de uma residência (19°0'45.49"S; 57°37'30.90"O) e também com armadilhas luminosas tipo CDC, instaladas entre as 18:00 h e 06:00 h. Para garantir a sobrevivência após a coleta, os insetos foram mantidos em gaiolas de náilon montadas em armação de metal (30 x 30 cm) que foram envolvidas com toalhas umedecidas para a manutenção da umidade. Fatias de maçã foram colocadas no interior das gaiolas como oferta de alimento até o momento do repasto sanguíneo em hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839).

O estabelecimento e manutenção da colônia foram realizados no Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que dista aproximadamente 450 km do local de coleta dos flebotomíneos. Foram adotados os protocolos propostos por KILLICK-KENDRICK et al. (1977a) e RANGEL et al. (1986) com adaptações, previamente descritas por OLIVEIRA et al. (artigo 1 submetido à publicação).

Infecção experimental com *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) amazonensis*

Para as tentativas de infecção experimental de *Lu. cruzi*, foram realizados xenodiagnóstico em cão e em hamsters.

Nos experimentos de infecção experimental por *Leishmania (L.) infantum* Nicolle, 1908 (sin. sênior de *Leishmania infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937), foram utilizados cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Campo Grande. Todos os animais apresentavam sintomatologia específica para

leishmaniose visceral canina, sorologia e exame parasitológico direto positivos para *Leishmania*.

Para a infecção por *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, foram utilizados dois hamsters infectados experimentalmente (cepa IFLA/BR/1967/PH8 fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou [CPqRR/FIOCRUZ-BH]) por via intradérmica no coxim plantar das patas traseiras. Durante o xenodiagnóstico os animais apresentavam lesões nodulares nas patas traseiras e no focinho.

O experimento com cães foi repedido seis vezes. Cada uma com um animal diferente, sempre das 18:00 às 19:00 h. Inicialmente, o cão sedado (tiopental sódico via intramuscular 40 a 80 mg/kg) foi colocado no interior de uma gaiola de náilon dividida em dois compartimentos (1,90 x 0,90 x 1,80 m, Figura 2). Em seguida, machos e fêmeas de *Lu. cruzi* de primeira geração (F1) com 3 a 4 dias de vida foram soltos no interior desta. A exposição do cão aos insetos durou cerca de uma hora em todas as tentativas. Decorridos os 60 min, os espécimes foram aspirados com capturador elétrico manual e transferidos para uma gaiola de náilon menor (30 x 30 cm), que foi envolta com uma toalha umedecida. Após 24h, as fêmeas foram individualizadas em potes de acrílico (2,50 x 3,50 cm) revestidos de gesso no fundo para a avaliação dos demais parâmetros descritos a seguir. Os potes foram vedados com tampa plástica que contem um orifício central (1,20 cm de diâmetro) revestido de tecido de náilon, sobre o qual foram colocados pequenos cubos de maçã. Dois grupos foram obtidos e acompanhados: um grupo de fêmeas alimentadas com sangue e outro de não alimentadas.

Os potes com as fêmeas individualizadas de ambos os grupos (alimentadas e não alimentadas) foram mantidos em um recipiente retangular de polietileno (34 x 14 cm), forrado na base com papel filtro umedecido e mantido com a tampa entreaberta dentro de uma câmara incubadora biológica B.O.D. MA-414® (Marconi, São Paulo, BR), com temperatura de 27-28 °C e umidade superior a 80%. Diariamente, os potes foram inspecionados três vezes ao dia (08:00, 14:00 e 20:00 h) para acompanhamento da mortalidade e oviposição, o que permitiu avaliar a sobrevivência diária (expectativa de vida após o xenodiagnóstico) e o ciclo gonotrófico (mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição).

Para os experimentos com os hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, diferindo apenas no tamanho da

gaiola utilizada (30 x 30 cm) usada para a exposição dos animais aos flebotomíneos. Foram realizadas três repetições, sendo as duas últimas com o mesmo animal.

Taxa de infecção e período de incubação extrínseco

A taxa de infecção foi obtida por meio da dissecação das fêmeas que morriam diariamente e da positividade para o DNA de *Leishmania* na reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, na ausência de fêmeas mortas naturalmente, uma amostra de duas a três fêmeas alimentadas foi sedada e dissecada para avaliar o período de incubação extrínseco em relação ao parasito. A técnica de dissecação foi realizada de acordo com JOHNSON et al. (1963) para expor o intestino e a espermateca das fêmeas e, conseqüentemente, pesquisar a presença de flagelados e confirmar a espécie de flebotomíneo. Após a dissecação e pesquisa de flagelados, o conteúdo da lamínula e do tubo digestivo dos espécimes, com presença ou não de flagelados, foi transferido e conservado individualmente em microtubos de 1,5 mL com álcool isopropílico. Em algumas ocasiões, especialmente na ocorrência de infecção maciça, após a transferência do material para o microtubo, tentou-se fixar e corar com solução de Errecart e Giemsa, respectivamente, o conteúdo residual presente na lâmina.

A taxa de infecção de *Lu. cruzi* para cada espécie de *Leishmania* foi calculada pela razão entre número de fêmeas positivas na PCR e o total de fêmeas alimentadas. A frequência de fêmea potencialmente infectadas foi obtida pela razão do número de fêmeas com pelo menos uma forma infectante entre os morfotipos observados de promastigota nos intestinos anterior e/ou torácico e total de fêmeas infectadas. A identificação de flagelados sugestivos de formas infectantes, as promastigotas metacíclicas, foi realizada considerando-se a localização (intestino anterior e região anterior do intestino médio) e a morfologia dos flagelados (corpo alongado com flagelo três ou mais vezes maior que o corpo) (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; ROGERS et al., 2002).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Para confirmar a infecção por *Leishmania*, todas as fêmeas utilizadas nos experimentos de infecção experimental pelo xenodiagnóstico foram submetidas à reação em cadeia da polimerase.

O conteúdo da lamínula e do tubo digestivo dos espécimes foi triturado com auxílio de pistilo plástico em microtubos de 1,5 mL com 300 µL da solução de resina Chelex® (Bio-Rad, Hercules, USA) a 5%. A solução foi misturada em vortex por 15 seg e centrifugada por 60 seg a 13000 rpm. Em seguida, a mistura colocada em banho-maria a 80 °C por 30 min. Decorrido este tempo, os procedimentos de mistura em vortex e centrifugação foram repetidos para a posterior retirada e transferência do sobrenadante para outro microtubo estéril. O produto da extração foi acondicionado sob refrigeração de – 20 °C.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pares de base (pb) de *Leishmania*. Para um volume final de 25 µL de reação foram adicionadas 5 µL de amostra, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 5,5 µL de água e 1 µL de cada oligonucleotídeo: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (EL TAI et al., 2000).

As condições de amplificação foram: 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min, com pós-extensão a 72 °C por 5 min, em termociclador (BIOER, Hangzhou, CHN). Como controles negativos da reação foram utilizados uma reação sem DNA contendo água e DNA de fêmeas F1 não alimentadas, e como controle positivo os DNA de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de cultura.

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 1,5% em Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e submetidos à corrida eletroforética a 100 v por 100 min em tampão TBE. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Os produtos das amostras positivas foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *HaeIII*, que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5', para identificar a espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al. 2003). Foi adicionado 1 µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima *HaeIII*, 1 µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C 'overnight'. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por 3 h.

Sobrevida

As funções de sobrevida para os grupos de fêmeas alimentadas com sangue e não alimentadas, infectadas e não infectadas foram estimadas utilizando-se o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier. E, a partir das curvas estimadas, foram calculadas as medidas descritivas, média e mediana. Adicionalmente, as curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando o teste *logrank*.

O estimador não paramétrico de Kaplan-Meier é, conforme COLOSIMO e GIOLO (2006), definido por:

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j < t} \left(\frac{n_j - d_j}{n_j} \right) = \prod_{j:t_j < t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j} \right),$$

em que:

- $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ são os k tempos distintos e ordenados em que ocorreram falhas (morte de fêmeas);
- d_j é o número de falhas em t_j , $j = 1, 2, \dots, k$, e
- n_j é número de fêmeas vivas (sob risco) em t_j , $j = 1, 2, \dots, k$, ou seja, as fêmeas que não morreram ou não tiveram morte induzidas até o dia anterior a t_j .

Na presença de observações censuradas (fêmeas anestesiadas para dissecação), a estimativa mais adequada para a mediana é obtida por meio de interpolação linear da curva de Kaplan-Meier e a estimativa do tempo médio de sobrevivência é dada por (COLOSIMO e GIOLO, 2006):

$$\hat{t}_m = t_1 + \sum_{j=1}^{k-1} \hat{S}(t_j)(t_{j+1} - t_j),$$

em que:

- $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ são os k tempos distintos e ordenados em que ocorreram falhas (morte de fêmeas);
- $\hat{S}(t)$ é o estimador de Kaplan-Meier.

Atratividade humana e canina aos flebotomíneos

A atratividade humana e canina aos flebotomíneos foi avaliada por meio de experimentos mensais durante março de 2013 a fevereiro de 2014. Para tal, utilizou-se o método descrito por PINTO et al. (2001) que consiste na utilização de barracas de poliéster impermeável (205 x 145 x 105 cm) com dois orifícios telados para a circulação do ar: um para a entrada e outro para a saída (Figura 3). No orifício para a entrada de ar foi acoplado um *cooler* com um dispositivo de controle da velocidade do ar introduzido na barraca. Do lado de fora, em frente ao outro orifício de saída do ar, foi instalada uma armadilha automática tipo CDC sem luz para capturar os flebotomíneos atraídos pelo ar expelido.

Em cada experimento foram utilizadas duas barracas que permaneciam montadas entre 18:00 e 6:00 h. No interior de uma, permanecia um humano e na outra, um cão. Ambas foram armadas simultaneamente dentro do mesmo peridomicílio, distando aproximadamente 18 m uma da outra, por duas noites consecutivas, alternando a posição de ambas a cada noite. Foram feitas 48 repetições seguindo o método descrito acima para avaliar a atratividade canina e humana à espécie alvo do estudo.

Como alternativa ao método inicial, a atratividade canina foi avaliada também por coletas (aspiração manual) realizadas diretamente sobre os cães. Para minimizar a interferência da possível atratividade humana, realizou-se um ciclo de 5 min de coleta sobre o cão e arredores (canil) com 10 min de pausa. Ainda foi realizada uma tentativa de adaptação do método de coleta da armadilha tipo Disney (DORVAL et al., 2007), com auxílio de discos metálicos (35 cm de diâmetro), semelhantes a assadeiras de pizza, lubrificados com óleo de rícino na superfície. Três discos foram fixados com auxílio de fita dupla face nas paredes internas de três canis durante três noites. Ambos os métodos alternativos descritos acima (aspiração e coleta com os discos metálicos) foram realizados no peridomicílio de residências da área urbana de Município de Corumbá.

Capacidade vetorial

A capacidade vetorial (V) foi estimada por meio da adaptação da fórmula proposta por REISEN (1989b) que considera:

$$V = \frac{m * a^2 * b * P^n}{-\ln P}$$

onde:

- m = densidade de flebotomíneos em relação ao hospedeiro;
- a = razão entre proporção de fêmeas alimentadas durante o xenodiagnóstico e a duração ciclo gonotrófico (mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição das fêmeas mantidas em colônia); este parâmetro é elevado ao quadrado porque para que haja a transmissão são necessários pelo menos dois repastos sanguíneos;
- b = proporção de fêmeas que se infectaram após o xenodiagnóstico e que desenvolveram formas infectantes do parasita;
- n = período de incubação extrínseco;
- P = probabilidade diária de sobrevivência: após o xenodiagnóstico, obtida a partir do seguimento diário das fêmeas para a obtenção curva de sobrevivência das fêmeas infectadas.

O termo $\frac{P^n}{-\ln P}$ presente no modelo proposto por REISEN (1989b) refere-se à expectativa de sobrevivência no tempo (em dias) em que foi completado o ciclo de desenvolvimento do parasita em uma população de fêmeas após o repasto sanguíneo em uma fonte de infecção. Portanto, o valor da expectativa de sobrevivência no tempo mediano do ciclo gonotrófico foi utilizado para estimar a capacidade vetorial, conforme proposto por OVALLOS (2011).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Uso Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS: 491/2013). O grupo de estudo possui Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: SISBio 25952-1).

RESULTADOS

Infecção experimental, ciclo gonotrófico e período de incubação extrínseco

As tentativas de infecção experimental pelo xenodiagnóstico foram realizadas em nove ocasiões: seis em cães e três em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*. No total, 832 fêmeas foram expostas aos hospedeiros infectados e 333 alimentaram-se durante os experimentos, conforme a tabela 1. Para os experimentos realizados com cães, a proporção de fêmeas alimentadas variou de 0,33 a 1,00, com valor total de 0,40 e médio de 0,68. Observou-se que esta proporção variou diretamente conforme o número de espécimes utilizado em cada repetição, diminuindo consideravelmente nas duas últimas. A proporção de alimentação durante os experimentos com hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* variou entre 0,39 e 0,43, com proporção total e média de 0,40.

Considerando todas as fêmeas alimentadas, independente da fonte alimentar, a mediana do ciclo gonotrófico foi de seis dias ($n = 37$), com valor mínimo de três e máximo de 15 dias. Para as fêmeas alimentadas apenas no cão ($n = 25$), a mediana do ciclo também foi de 6 dias, com valor mínimo de 3 e máximo de 15 dias. No entanto, para as fêmeas alimentadas nos hamsters, o ciclo foi de cinco dias ($n = 11$; mínimo = 4; máximo = 9).

A tabela 2 apresenta o número de fêmeas alimentadas, dissecadas, infectadas e potencialmente infectadas segundo hospedeiro e espécie de *Leishmania*. Das 333 fêmeas alimentadas em todos os experimentos, foi possível observar formas flageladas em 43. A análise molecular demonstrou a presença de DNA do parasito em 59 espécimes.

Nos experimentos realizados em cães, a taxa infecção obtida a partir da análise molecular (PCR) foi de 10,55% (27/256). Considerando apenas o exame microscópico direto, a taxa de infecção foi 7,42% (19/256) e todas fêmeas apresentavam formas compatíveis com promastigotas metacíclicas. Em apenas uma das seis repetições as fêmeas infectaram-se experimentalmente, ou seja, dos seis cães utilizados, em apenas um foi possível obter a infecção experimental de *Lu. cruzi*. Nesta ocasião, a taxa de infecção foi de 35,53% (27/76). Até o quinto dias

após o repasto sanguíneo foi possível observar sangue no intestino médio de algumas fêmeas.

Com relação aos três experimentos realizados em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, a taxa de infecção encontrada foi de 41,56% (32/77). Nas três repetições foi possível obter a infecção experimental dos flebotomíneos. Das 24 fêmeas visualizadas com formas flageladas, três não apresentavam formas infectantes. Fêmeas com sangue no trato intestinal foram observadas até o quarto dia, com destaque para uma fêmea, que apesar de apresentar sangue no intestino, foi visualizada com formas flageladas na cabeça e na porção anterior do intestino médio no terceiro dia pós-alimentação. Outro ponto importante foi o encontro de duas fêmeas com infecção maciça de flagelados compatíveis com formas infectantes ao longo do tubo intestinal, da cabeça até a porção final do intestino médio, após o quinto dia da infecção experimental. Na figura 4 é possível visualizar uma promastigota corada a partir do conteúdo residual presente na lâmina após a dissecação.

O DNA de *Leishmania* foi detectado pela PCR em todas as fêmeas positivas ao exame microscópico direto para a pesquisa de flagelados. Entretanto, 16 espécimes considerados negativos durante o exame direto foram positivos na PCR. A análise de polimorfismo de fragmentos de restrição realizada pela digestão das amostras positivas com a enzima *HaeIII* confirmou as espécies de *Leishmania* utilizadas para a infecção experimental, separando *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 5).

O período de incubação extrínseca no flebotomíneo para ambas as espécies de *Leishmania* foi de três dias, independente do hospedeiro. No entanto, formas promastigotas metacíclicas foram observadas no intestino anterior (cabeça) a partir do quarto dia. Até o décimo e décimo primeiro dia foi possível observar formas flageladas nas fêmeas alimentadas no cão e nos hamsters, respectivamente.

Sobrevida

As funções de sobrevida para os grupos analisados foram estimadas utilizando-se o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier e estão apresentadas na figura 6. A partir das curvas estimadas foi possível obter as medidas descritivas, média e mediana, que estão apresentadas na tabela 3. Ambas as medidas indicam

que a sobrevivência das fêmeas é menor para os grupos de fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo, independente da fonte alimentar e/ou de infecção (cão ou hamster). Pelo teste logrank rejeita-se a hipótese de igualdade das funções de sobrevivência dos grupos de fêmeas alimentadas e não alimentadas, com p -valor $< 0,001$ e $0,0247$, para a coorte exposta aos cães e aos hamsters, respectivamente.

Com relação aos grupos de fêmeas infectadas e não infectadas, observou-se que a presença do parasito parece não influenciar a probabilidade diária de sobrevivência das fêmeas infectadas com *L. (L.) infantum*. Pelo teste logrank (p -valor = $0,28$) não se rejeita a hipótese de igualdade das funções de sobrevivência destes grupos. No entanto, verificou-se que as fêmeas infectadas com *L. (L.) amazonensis* apresentaram probabilidade de sobrevivência significativamente maior em comparação com as alimentadas, mas não infectadas (p -valor = $0,02$).

A expectativa de sobrevivência no tempo mediano em que fêmeas infectadas por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* completaram o ciclo gonotrófico foi de $1,32$ e $0,43$, respectivamente.

Atratividade humana e canina aos flebotomíneos

A atratividade dos hospedeiros aos flebotomíneos foi avaliada por meio de três metodologias diferentes (Tabela 4). Seguindo a metodologia proposta por PINTO et al. (2001), foram realizadas 24 repetições (12 para cada hospedeiro) para avaliar a atratividade canina e humana à *Lu. cruzi*. Destas, apenas cinco repetições apresentaram resultados positivos para *Lu. cruzi*, além de outras espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia forattinii* Galati, Rego Jr., Nunes & Oshiro, 1985, *Evandromyia corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989), *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) e *Micropygomyia peresi* (Mangabeira, 1942). Nas outras 43 tentativas não foram capturados exemplares de flebotomíneos. Destaca-se ainda que $81,56\%$ do total de espécimes foram coletados em duas repetições realizadas simultaneamente, sendo 595 (578 machos e 17 fêmeas) na barraca com humano e 604 (574 machos e 30 fêmeas) na barraca com cão.

Nas coletas realizadas diretamente sobre o cão foram capturados 209 espécimes (45 machos e 164 fêmeas), todos da espécie *Lu. cruzi*. Na primeira tentativa foram capturadas 131 fêmeas durante uma hora e 30 min. (19:00 – 20:30 h), 29 na segunda durante o mesmo período da primeira, 04 na terceira durante

cinco horas (18:00 – 23:00 h) e nenhum na quarta durante três (18:00 – 21:00 h). Somente nas duas primeiras ocasiões a coleta foi realizada na mesma residência e sobre o mesmo animal. Os resultados obtidos nesta metodologia foram considerados para a estimativa da capacidade vetorial, ou seja, 164 fêmeas coletadas em um cão durante quatro dias, o que gerou a densidade de 41 fêmeas/cão/dia.

As coletas com os discos metálicos, realizadas como uma tentativa de adaptação ao princípio de coleta da armadilha tipo Disney, foram executadas seis ocasiões. Em duas não foram coletados flebotomíneos. Nas demais, foram coletados 36 espécimes, sendo 31 de *Lu. cruzi* e 05 de *Mi. peresi* (Tabela 4).

Capacidade vetorial

Embora tenham sido desenvolvidos ensaios de infecção experimental para *L. (L.) amazonensis*, a capacidade vetorial será estimada apenas para *L. (L.) infantum*, uma vez que os parâmetros de densidade de flebotomíneos em relação ao hospedeiro e de atratividade necessitariam ser realizados em hospedeiros conhecidos de *L. (L.) amazonensis* na área de estudo.

Portanto, considerando os resultados dos parâmetros apresentados, a capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* é de 0,24, ou seja, espera-se que a população de fêmeas da área produzam 0,24 novas infecções por dia de exposição de uma fonte de infecção.

DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs a estudar alguns parâmetros envolvidos na capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para o protozoário *L. (L.) infantum*. No Brasil, a distribuição geográfica deste flebotomíneo limita-se aos biomas Cerrado e Pantanal, com ocorrência nos estados de Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1985, 1997; CASARIL et al., 2014), Mato Grosso (BRITO et al., 2014; MISSAWA e LIMA, 2006; MISSAWA et al., 2011) e Goiás (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; GALATI, 2003). Também há relatos da presença de *Lu. cruzi* na Bolívia (BRAZIL et al., 2010).

A primeira suspeita da participação de *Lu. cruzi* na transmissão do parasito ocorreu com base em evidências eco-epidemiológicas, durante a década de 80 no

Município de Corumbá, Estado de Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997). Mais tarde, outros trabalhos realizados na região reforçaram esta hipótese, principalmente pelo encontro de flebotomíneo naturalmente infectado pelo parasito (PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998) e ausência de *Lu. longipalpis*, vetor comprovado de *L. (L.) infantum* no Novo Mundo (CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1985, 1997; SANTOS et al., 1998). SANTOS et al. (1998) incriminaram a espécie como vetor de *L. (L.) infantum* devido ao encontro de formas flageladas na região anterior do intestino médio de 14 fêmeas, de um total de 3575 espécimes dissecados. Ainda considerando apenas o encontro de infecção natural e a densidade populacional, outros autores têm incriminado *Lu. cruzi* como vetor no Município de Jaciara (BRITO et al., 2014; MISSAWA et al., 2011). No entanto, além da infecção natural pelo parasito, para que um inseto seja incriminado e comprovado como vetor, alguns preceitos devem ser obedecidos, entre os quais se destacam a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana e a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK e WARD, 1981; READY, 2013).

Poucos estudos têm avaliado questões inerentes à biologia e comportamento de *Lu. cruzi*. Consequentemente, para esta espécie ainda não foi relatado nenhum dos parâmetros da interação vetor-parasito, necessários para a comprovação vetorial. Os resultados demonstraram que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram capazes de se desenvolver em *Lu. cruzi*, sendo esta a primeira descrição de aspectos relacionados a interação flebotomíneo-*Leishmania* envolvendo *Lu. cruzi*.

A proporção de fêmeas alimentadas neste estudo variou entre 0,33 e 1,00, independente do hospedeiro utilizado nos experimentos. Apesar da taxa total de alimentação ter sido igual para ensaios realizados em cães e hamsters, observou-se uma maior variabilidade nas taxas individuais nos ensaios realizados em cães, sendo que a taxa de alimentação foi inversamente proporcional à quantidade de espécimes de flebotomíneos liberadas na gaiola para o xenodiagnóstico. Embora fatores ambientais, como temperatura e umidade, e o tempo de exposição possam influenciar a taxa de alimentação desses insetos, este fato também pode ser explicado pela competitividade por espaço para o pouso e, posterior, do repasto sanguíneo, dado o aumento da densidade de insetos no interior da gaiola (DINIZ et al., 2014).

A influência da temperatura deve ser cuidadosamente avaliada em estudos de infecção experimental, uma vez que insetos são poiquilotérmicos e a sua temperatura interna varia consideravelmente com a temperatura ambiente, o que pode afetar a interação vetor-parasito e a probabilidade de exposição à infecção, relacionada à preferência alimentar e à taxa de picadas no hospedeiro. Todavia, o papel do clima sobre desenvolvimento do parasita em insetos vetores tem recebido pouca atenção (PARHAM et al., 2015). Para *L. (L.) infantum*, RIOUX et al. (1985) observaram que o parasito se desenvolveu melhor no vetor *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, em temperaturas elevadas. Ao avaliar o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) peruviana* Velez, 1913 em *Lu. longipalpis* e de *L. (L.) infantum* em *Lu. longipalpis* e em *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, HLAVACOVA et al. (2013) relataram que o desenvolvimento das fases iniciais da infecção esteve relacionado à temperaturas mais elevadas. No entanto, *L. (V.) peruviana* demonstrou estar adaptada à temperaturas mais baixas. Neste estudo, durante os experimentos com cães, a temperatura e a umidade relativa do ar variaram entre 22,12 a 28,43 °C e 43,67 a 85,83%, respectivamente, e parece não ter influenciado significativamente as taxas obtidas de alimentação (dados não mostrados).

Ao infectar experimentalmente fêmeas colonizadas de *Lu. longipalpis*, espécie filogeneticamente próxima de *Lu. cruzi*, com *L. (L.) infantum*, SECONDINO et al. (2012) relataram uma taxa de alimentação de 80,00% (640/800) utilizando um dispositivo artificial de alimentação com membrana de filhotes de galinha (pintinho) e sangue de camundongo. Para a combinação *Lu. longipalpis* e *L. (L.) amazonensis*, KILLICK-KENDRICK et al. (1977b), citaram uma taxa de 88,90% (8/9) e 9,10% (4/44) para o segundo e terceiro repasto sanguíneo, respectivamente, em hamsters experimentalmente infectados.

Alguns autores sugerem que o parasita possa modelar e manipular o tempo de alimentação sanguínea de seus flebotomíneos hospedeiros para que este coincida com o pico de formas infectantes no bloqueio da porção anterior do intestino médio causado pelo *promastigote secretory gel (PSG plug)*, o que levaria a múltiplas tentativas de repasto (ROGERS e BATES, 2007). O tempo estimado para novos repastos sanguíneos pode ser avaliado pela duração do ciclo gonotrófico. Os resultados deste trabalho demonstraram que a mediana do ciclo gonotrófico foi de seis dias, com valor mínimo de três e máximo de 15 dias. Estes dados assemelham-

se aos de *Lu. longipalpis* descritos por OVALLOS (2011), cuja duração mediana do ciclo gonotrófico foi de cinco dias, variando entre três e 10 dias. Para as espécies *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Migonemyia migonei* (França, 1920), *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e *Expapillata firmatoi* (Barretto, Martins & Pellegrino, 1956), a mediana do ciclo gonotrófico descrita por DINIZ et al. (2014) variou de quatro a oito dias, com período mínimo de três para *Ex. firmatoi*, *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* e o máximo de oito para *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*.

Muitos estudos têm utilizado dispositivos artificiais de alimentação com membranas, como pele de pinto, em experimentos de infecção experimental para diversas finalidades (FREITAS et al., 2012; MONTOYA-LERMA et al., 2003; ROGERS e BATES, 2007). Embora, através dessa metodologia, seja possível controlar e quantificar diversos fatores, tais como a carga parasitária exposta e a forma evolutiva do parasita utilizada durante a alimentação, outros fatores importantes são suprimidos, como as questões ambientais e imunológicas inerentes aos hospedeiros e ao parasito que estão envolvidas na dinâmica de transmissão. Em contrapartida, as metodologias realizadas com animais infectados estão mais próximas das condições naturais (LAINSON et al., 1979).

Todos os cães utilizados neste estudo durante o xenodiagnóstico eram sintomáticos e com exame parasitológico direto positivo para *Leishmania*. Todavia, em somente uma ocasião foi possível obter a infecção experimental das fêmeas expostas. Fatores como o tempo de infecção, a carga parasitária cutânea, a condição da pele dos hospedeiros mamíferos e sua condição imunológica, separadamente ou em combinação, podem explicar a baixa taxa de infecção (SILVA et al., 1990) obtida neste estudo quando comparado aos estudos com uso de dispositivos artificiais de alimentação.

Os resultados demonstraram uma taxa de infecção para *L. (L.) infantum* de 10,55% e de 41,56% para *L. (L.) amazonensis*. MONTOYA-LERMA et al. (2003) empregaram quatro metodologias para comparar a eficiência vetorial de *Lu. longipalpis* e *Pintomyia evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) para *L. (L.) infantum*, sendo duas com os mesmos hospedeiros utilizados no presente estudo e outras duas com membranas artificiais de alimentação. Expondo somente a orelha ou a região abdominal próxima a virilha de cães poli e oligossintomóticos para leishmaniose visceral canina, as taxas médias de infecção variaram entre zero e 6,80% para *Lu.*

longipalpis e entre zero e 4,40% para *Pi. evansi*, durante 20 min de exposição. Adicionalmente, *Lu. longipalpis* alimentou com mais avidéz e apresentou infecções massivas, enquanto *Pi. evansi* desenvolveu apenas infecções leves. Nos experimentos com hamster, as taxas de infecção foram significativamente menores para ambas as espécies de flebotomíneos, o que está em desacordo com os resultados atuais.

Considerando somente fêmeas positivas durante a dissecação de coortes de seis espécies de flebotomíneos expostas a hamsters infectados com *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916, DINIZ et al. (2014) descreveram taxas de infecção que variaram de 6,20 a 34,40%. Para *Lu. longipalpis*, as taxas de infecção descritas baseadas apenas na dissecação e exame microscópico de fêmeas expostas a cães com leishmaniose visceral canina variam de zero (SHERLOCK, 1996) a 42,00% (LARANGEIRA, 2008). As taxas de infecção apresentadas no presente trabalho foram calculadas com base na positividade encontrada na reação em cadeia da polimerase, que é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e especificidade independentemente do número, forma evolutiva e localização do parasita no flebotomíneo (PEREZ et al., 1994; PITA-PEREIRA et al., 2005). Possivelmente, além da maior sensibilidade apresentada pela análise molecular, as 14 amostras positivas na PCR, mas negativas ao exame microscópico direto após a dissecação morreram durante a noite e foram dissecados muito tempo após a morte. Embora as combinações parasita-vetor-hospedeiro sejam diferentes, este é um dos fatos que poderiam explicar as diferenças nas taxas de infecção em alguns estudos. Ao considerar somente a dissecação/exame microscópico direto, as taxas de infecção encontradas neste estudo foram de 7,42 e 31,17% para a coorte alimentada em cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* e em hamsters experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis*, respectivamente.

Como relatado por MONTROYA-LERMA et al. (2003), resultados de experimentos de infecções experimentais devem ser interpretados com cautela, pois a infecção pode ser modulada por vários fatores e, mesmo em associações coevolutivas, graus variáveis de refratariedade ou permissividade podem ser esperados. A maior taxa de infecção obtida para na combinação *Lu. cruzi*/*L. (L.) amazonensis* pode ser explicada pelo grau de parasitismo cutâneo exibido pelos hamsters utilizados, quando comparado aos cães infectados com *L. (L.) infantum*. Mesmo não sendo possível quantificar o parasitismo cutâneo dos hospedeiros

utilizados, acredita-se que as lesões nodulares presentes nos hamsters continham um maior número de amastigostas, aumentando as chances de infecção das fêmeas.

Embora ainda não existam relatos do encontro de *Lu. cruzi* naturalmente infectada por *L. (L.) amazonensis*, sua espécie irmã, *Lu. longipalpis* tem sido encontrada com infecção natural pelo parasito em regiões endêmicas para leishmaniose cutânea (PAIVA et al., 2006; SAVANI et al., 2009). A infecção experimental de *Lu. longipalpis* por *L. (L.) amazonensis* foi demonstrada inicialmente por KILLICK-KENDRICK et al. (1977b) e posteriormente por SILVA et al. (1990) e SHERLOCK (1996). Este último autor também relatou a transmissão do parasito para hamsters previamente sadios por meio da picada de fêmeas de *Lu. longipalpis*, alertando para o possível papel deste inseto na transmissão do parasito para outros hospedeiros vertebrados, incluindo a população canina.

Neste estudo, *Lu. cruzi* permitiu o desenvolvimento e a manutenção de todas as fases de *L. (L.) amazonensis*. Adicionalmente, foi possível observar a infecção maciça em algumas fêmeas. Estes fatos sugerem que o mecanismo de adesão do protozoário ao epitélio intestinal do flebotomíneo não seja espécie-específico, sendo, portanto, independente do lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície de *Leishmania* (MYSKOVA et al., 2007; VOLF e MYSKOVA, 2007), como ocorre em outros vetores considerados permissivos por permitirem a manutenção e desenvolvimento da infecção por mais de uma espécie de *Leishmania* (KAMHAWI, 2006; PIMENTA et al., 1994; ROGERS et al., 2002, 2004).

O período de incubação extrínseco ou o tempo em dias para o aparecimento de formas promastigota metacíclicas no intestino anterior e/ou na região anterior do intestino médio pode variar de acordo com a combinação espécie de *Leishmania*/flebotomíneo e com as condições ambientais (PIMENTA et al., 2012; ROGERS et al., 2002, 2004). Para as combinações de *Lu. longipalpis* com *L. (L.) infantum* (FREITAS et al., 2012) e *L. (L.) mexicana* (ROGERS et al., 2002), formas progastigotas metacíclicas podem ser observadas na porção anterior do intestino médio a partir do quarto dias após o repasto sanguíneo em uma fonte de infecção experimental. ROGERS et al. (2002) observaram promastigotas metacíclicas em baixas quantidades na porção média do intestino médio a partir do terceiro dia. No entanto, devido a sua localização, essas formas não desempenhariam um papel significativo na transmissão. Para as combinações de seis espécies de

flebotomíneos infectadas com *L. (V.) braziliensis*, o período de incubação extrínseco variou de quatro a seis dias. Neste estudo, promastigotas metacíclicas foram observadas na região anterior do intestino médio no terceiro dia e no intestino anterior a partir do quarto dia para ambas as combinações *Leishmania*/flebotomíneo.

Acredita-se que o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral com comprovação parasitológica nas Américas tenha ocorrido no Distrito de Porto Esperança, Município de Corumbá (DEANE, 1956; MIGONE, 1913). Com base nesta relação temporal, alguns autores sugerem que a interação entre *Lu. cruzi* e *L. (L.) infantum* seja antiga (FERREIRA et al., 2012). Estudos de filogenia de *L. (L.) infantum* demonstraram que no Brasil coexistem três populações do parasito, sendo que uma delas ocorre quase que predominantemente no Estado de Mato Grosso do Sul (FERREIRA et al., 2012). Devido à concentração e maior aptidão de dois genótipos na região Centro-Oeste do Brasil, foi considerada a hipótese de uma possível adaptação dessas populações de *L. (L.) infantum* aos componentes do ciclo de transmissão, como a participação de *Lu. cruzi* na transmissão. Os autores ainda sugerem que este flebotomíneo possa ter desempenhado um papel importante na formação da estrutura genética de uma população de *L. (L.) infantum*. Nesta situação, estudos sobre a filogeografia podem ser úteis para elucidar a diversidade da interação parasito-vetor, uma vez que ambos, parasito e flebotomíneos, apresentam biogeografias similares (READY, 2013).

O efeito da infecção por *Leishmania* sobre a longevidade e fecundidade de flebotomíneos ainda é pouco conhecido (KAMHAWI, 2006). EL SAWAF et al. (1994) constataram que infecções com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) major* diminuíram a longevidade e produção de ovos de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) e de *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu, 1930, quando comparado a fêmeas alimentadas mas não infectadas. Embora o mecanismo pelo qual a sobrevivência e a postura de ovos tenham diminuído não esteja claro, os autores levantaram a hipótese de que lesões na válvula estomodeal, induzidas pela quitinase produzida pelo parasita, possam estar relacionadas aos resultados encontrados. Alguns autores também citam o estresse causado pela infecção como uma possível causa de redução da longevidade (ROGERS e BATES, 2007). Em contrapartida, SANT'ANNA et al. (2014) constataram que a infecção de *Lu. longipalpis* por *L. (L.) mexicana* conferiu proteção contra infecções bacterianas, o que poderia influenciar indiretamente a sobrevivência dos insetos. Os dados deste trabalho demonstraram que houve diferença

significativa nas funções de sobrevivência dos grupos de fêmeas alimentadas e não alimentadas, sugerindo que o repasto sanguíneo, neste caso, diminuiu a probabilidade de sobrevivência diária. Este fato pode ser explicado pela oviposição, uma vez que devido à concordância gonotrófica, apenas fêmeas alimentadas com sangue seriam capazes de realizar maturação e postura de ovos, o que normalmente causa estresse e exaustão, culminando com a morte (KILLICK-KENDRICK e RIOUX, 2002; LEHANE, 1991). Reforça esta hipótese a presença de quedas acentuadas em ambas as curvas de probabilidade de sobrevivência para fêmeas ingurgitadas no quinto dia após o repasto sanguíneo (Figuras 5A e 5B), ou seja, um dia antes da mediana do ciclo gonotrófico.

Neste estudo, a infecção por *L. (L.) infantum* não influenciou a probabilidade diária de sobrevivência das fêmeas ingurgitadas. Em contrapartida, fêmeas infectadas por *L. (L.) amazonensis* apresentaram probabilidade de sobrevivência significativamente maior em comparação com as alimentadas, mas não infectadas. Estudos adicionais com número amostral maior de fêmeas seguidas se faz necessário para consolidar estes dados.

Com relação à atratividade canina e humana aos flebotomíneos, as três metodologias utilizadas não apresentaram resultados semelhantes, diferindo tanto na quantidade e frequência de espécimes coletados. Os experimentos executados com as barracas tiveram o maior rendimento e diversidade de espécies. No entanto, em apenas cinco das 48 repetições apresentaram resultados positivos. Acredita-se que os 1199 espécimes capturados em duas repetições realizadas simultaneamente seja resultado de uma possível explosão populacional ocorrida naquele dia, uma vez que todas as fêmeas capturadas eram nulíparas e não estavam alimentadas. PINTO et al. (2001) avaliaram e compararam a atratividade de *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) a odores humanos e ao dióxido de carbono (CO₂) com a mesma metodologia utilizando barracas. Para ambas as espécies, a proporção de atratividade humana atribuível ao CO₂ foi significativamente menor para os machos. A atratividade de outros hospedeiros como galinhas e canídeos para os flebotomíneos é descrita com frequência na literatura (LAINSON e RANGEL, 2005). Ao avaliar a atratividade de um hospedeiro a determinadas espécies de insetos hematófagos, avalia-se também a taxa de picadas do vetor no hospedeiro, que é um dos parâmetros utilizados para estimar a capacidade vetorial, entendida como a quantidade diária de picadas

potencialmente infectantes que uma população de vetores necessita para transmitir o agente para um determinado hospedeiro ao exercer a hematofagia (GARRETT-JONES, 1964, REISEN, 1989).

Devido à dificuldade para obter dados que representem atratividade e a taxa de picada de flebotomíneos em diferentes hospedeiros, dados referentes ao hábito e preferência alimentar destes insetos podem ser utilizados para avaliar estes parâmetros. Para *Lu. cruzi*, BRITO et al. (2014), realizaram a análise do hábito alimentar de fêmeas capturadas ingurgitadas e descreveram um percentual de 27,90% de positividade para sangue de aves, 3,30% de cães e 1,60 de gambás. As combinações ave/gambá e cão/gambá representaram 1,60% cada uma. Não foram encontradas fêmeas com sangue humano no trato intestinal das fêmeas analisadas.

Por fim, a estimativa da capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* foi de 0,24, o que é 8,41 vezes menor que a descrita por OVALLOS (2011) para *Lu. longipalpis* para *L. (L.) infantum*. Entretanto, a equação utilizada pelo autor não considera o parâmetro *a* (razão entre proporção de fêmeas alimentadas durante o xenodiagnóstico e a duração ciclo gonotrófico) elevado ao quadrado. Elevando-se ao quadrado o valor de *a* obtido por OVALLOS (2011), a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* para *L. (L.) infantum* é igual a 0,28, portanto, próximo ao valor encontrado para *Lu. cruzi*. Este trabalho apresentou importantes resultados obtidos a partir da infecção experimental de *Lu. cruzi* que possibilitaram a avaliação de parâmetros envolvidos na capacidade vetorial do inseto para *Leishmania*. O caráter permissivo de *Lu. cruzi* foi sugerido após a manutenção de todas as fases de *L. (L.) amazonensis* em seu trato digestivo. Estes dados indicam a necessidade de outros estudos para avaliar a dinâmica de transmissão do parasito em regiões com registros de *Lu. cruzi*, bem como a pesquisa e identificação da espécie de *Leishmania* em possíveis reservatórios, além do cão, presentes em áreas endêmicas ou de transmissão esporádica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 3, p. 207-255.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BRAZIL, R. P.; PASSOS, W. L.; BRAZIL, B. G.; TEMELJKOVITCH, M.; ANDRADE FILHO, J. D. Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840: Range extension and new records from lowland Bolivia. **Check List**, v. 6, n. 4, p. 587-588, 2010.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BRITO, V. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C. O.; SOUSA, V. R. F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

CASANOVA, C.; NATAL, D.; SANTOS, F. A. M. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of american cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 42-50, 2009.

CASARIL, A. E.; MONACO, N. Z. N.; OLIVEIRA, E. F.; EGUCHI, G. U.; PARANHOS FILHO, A. C.; PEREIRA, L. E.; OSHIRO, E. T.; GALATI, E. A. B.; MATEUS, N. L. F.; OLIVEIRA, A. G. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 364, 2014.

COLOSIMO E. A., GIOLO S. R. **Análise de Sobrevida Aplicada**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

DINIZ, M. M. C. S. L.; OVALLOS, F. G.; GOMES, C. M. C.; LAVITSCHKA, C. O.; GALATI, E. A. B. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 139, 2014.

DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; CUNHA, R. V. Modification of Disney trap for capture of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 877-878, 2007.

EL SAWAF, B. M.; EL SATTAR, S. A.; SHEHATA, M. G.; LANE, R. P.; MORSY, T. A. Reduced longevity and fecundity in *Leishmania*-infected sand flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 767-70, 1994.

EL TAI, N. O.; OSMAR, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W. H.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

FERREIRA, G. E. M.; dos SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E. C.; RAMOS, T. P. B.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36242, 2012.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-51.

GALATI, E. A. B.; REGO JÚNIOR, F. A.; NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T. Fauna flebotomínica do município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyia forattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, n.2, p. 261-266, 1985.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GARRET-JONES, C. The human blood index of malaria vectors in relations to epidemiological assessment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 30, p. 241-261, 1964.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro clínico, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 955-958, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas da população residente: Corumbá, Mato Grosso do Sul. 2014. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=500320&idtema=130&se arch=mato-grosso-do-sul|corumba|estimativa-da-populacao-2014->. Acesso em 12 de janeiro de 2015.

JOHNSON, P.T.; McCONNELL, E.; HERTIG, M. Natural infections of Leptomonad flagellates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. **Experimental Parasitology**, v. 14, p. 107-122, 1963.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A. J.; READY, P. D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 4-5, p. 429-440, 1977a.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A. J.; READY, P. D.; MOLYNEUX, D. H.; *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 196, p. 105-115, 1977b.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. **Parasitologia**, v. 44, n. 1-2, p. 67-71, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R. D. Ecology of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 82, p. 143-152, 1981.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. Part VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 206, p. 307-318, 1979.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. 79 f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

LEHANE, M. J. **Biology of blood-sucking insects**. London: Harper-Collins Academic, 1991.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B. L.; LANE, R. P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and

Lu. longipalpis for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v. 85, n. 1, p. 19-29, 2003.

MYSKOVA, J.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, S. M.; VOLF, P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 317-324, 2007.

NATAL, D.; MARUCCI, D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 418-420, 1984.

OVALLOS, F. G. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fisheri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas**. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2011.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PARHAM, P. E.; WALDOCK, J.; CHRISTOPHIDES, G. K.; HEMMING, D.; AGUSTO, F.; EVANS, K. J.; FEFFERMAN, N.; GAFF, H.; GUMEL, A.; LADEAU, S.; LENHART, S.; MICKENS, R. E.; NAUMOVA, E. N.; OSTFELD, R. S.; READY, P. D.; THOMAS, M. B.; VELASCO-HERNANDEZ, J.; MICHAEL, E. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 370, n. 1665, pii. 20130551, 2015.

PEREZ, J. E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.; PAZ, L.; NIETO, E.; AREVALO, J.; GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 161-164, 1994.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; MOGI, G. G.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S.; SACKS, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 19, p. 9155-9159, 1994.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: SILVA NETO (Org.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT), 2012.

PINTO, M. C.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; LOZOVEI, A.L.; TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 2, p. 132-139, 2001.

PITA-PEREIRA D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRAZIL, R. P.; BERTHO, A. L.; DE FIGUEIREDO BARBOSA, A.; BRITTO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. Biologia de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-154, 2014.

REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: relationship to disease transmission by malaria and arbovirus vectors. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 14, n. 1, p. 67-70, 1989a.

REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: introduction. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 14, n. 1, p. 39-40, 1989b.

RIOUX, J. A.; ABOULKER, J. P.; LANOTTE, G.; KILLICK-KENDRICK, R.; MARTINI-DUMAS, A. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir 1921. Experimental study. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 60, n. 3, p. 221-229, 1985.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. e91, 2007.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 498-507, 2002.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sandflies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, p. 463-467, 2004.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

SANT'ANNA, M. R.; DIAZ-ALBITER, H.; AGUIAR-MARTINS, K.; AL SALEM, W. S.; CAVALCANTE, R. R.; DILLON, V. M.; BATES, P. A.; GENTA, F. A.; DILLON, R. J. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 329, 2014.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SCHÖNIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWYNOCH, C.; SCHALLIG, HDFH; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SECUNDINO, N. F.; FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C.; DAVID, B. A.; PIMENTA, P. F. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 20, 2012.

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SMITH, D. L.; BATTLE, K. E.; HAY, S. I.; BARKER, C. M.; SCOTT, T. W.; McKENZIE, F. E. Ross, Macdonald, and a Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002588, 2012.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **TRENDS in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 91-92, 2007.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva: WHO, 2010.

Tabela 1 – Fêmeas de *Lutzomyia cruzi* alimentadas durante o xenodiagnóstico, segundo hospedeiro e espécie de *Leishmania*.

Repetição	Cão [<i>L. (L.) infantum</i>]			Hamster [<i>L. (L.) amazonensis</i>]		
	Fêmeas expostas	Fêmeas alimentadas	Proporção de fêmeas alimentadas	Fêmeas expostas	Fêmeas alimentadas	Proporção de fêmeas alimentadas
1	16	12	0,75	95	37	0,39
2	11	7	0,64	41	16	0,39
3	5	4	0,80	56	24	0,43
4	7	7	1,00	...	...	...
5	143	76	0,53	...	...	...
6	458	150	0,33	...	...	...
Total	640	256	0,40	192	77	0,40

... experimento não realizado.

Tabela 2 – Número de fêmeas de *Lutzomyia cruzi* alimentadas, dissecadas, infectadas e potencialmente infectadas, segundo hospedeiro e espécie de *Leishmania*.

Dias após xenodiagnóstico	Cão [<i>L. (L.) infantum</i>]			Hamster [<i>L. (L.) amazonensis</i>]		
	Dissecadas	Infectadas (pot. inf.)	Fêmeas positivas (PCR)	Dissecadas	Infectadas (pot. inf.)	Fêmeas positivas (PCR)
1	31	0 (0)	0	6	0 (0)	0
2	15	0 (0)	0	13	0 (0)	1
3	19	2 ^a (2 ^a)	2	10	5 ^{b,c} (5 ^{b,c})	5
4	19	6 (6)	6	11	5 (5)	6
5	38	2 (2)	5	15	7 (5)	9
6	23	1 (1)	3	8	2 (1)	5
7	31	3 (3)	5	7	2 (2)	3
8	32	3 (3)	4	4	1 (1)	1
9	6	0 (0)	0	2	1 (1)	1
10	12	2 (2)	2	0	0 (0)	0
11	6	0 (0)	0	1	1 (1)	1
12	6	0 (0)	0	...	...	...
13	5	0 (0)	0	...	...	...
14	2	0 (0)	0	...	...	...
15	7	0 (0)	0	...	...	...
16	3	0 (0)	0	...	...	...
21	1	0 (0)	0	...	...	...
Total	256	19 (19)	27	77	24 (21)	32
Taxa de infecção (%)		10,55			41,56	
Pot. inf. / infectadas (%)		100,00			87,50	

... não se aplica; a: 02 fêmeas anestesiadas para dissecação; b: 04 fêmeas anestesiadas para dissecação; c: presença de sangue no tudo digestivo de 01 fêmea; pot. inf.: potencialmente infectadas; PCR: reação em cadeia da polimerase.

Tabela 3 – Medidas descritivas (em dias) obtidas pelo estimador Kaplan-Meier segundo hospedeiros e espécie de *Leishmania*.

Medidas	Cão [<i>L. (L.) infantum</i>]				Hamster [<i>L. (L.) amazonensis</i>]			
	Ingurgitadas		Infectadas		Ingurgitadas		Infectadas	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Mediana	6,43	7,47	6,43	6,49	4,10	5,06	4,68	2,90
Média	6,49	8,59	5,36	6,91	4,55	5,32	5,43	3,89

Tabela 4 – A atratividade dos hospedeiros aos flebotomíneos de acordo com as diferentes metodologias empregadas.

Metodologia	N	<i>Lu. cruzi</i>		<i>Lu. forattinii</i>		<i>Ev. corumbaensis</i>		<i>Ev. sallesi</i>		<i>Mi. peresi</i>		Total
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
Barraca (humano)	24	588	23	...	01	01	...	...	01	...	01	615
Barraca (cão)	24	573	32	01	...	...	04	...	...	...	...	610
Aspiração (cão)	04	45	164	...	...	...	...	...	...	...	...	209
Adaptação Disney (cão)	06	27	4	...	...	...	...	...	...	03	02	36
Total	-	1235	221	01	01	01	04	00	01	03	03	1470

... não observado; N: número de repetições; *Lu.*: *Lutzomyia*; *Ev.*: *Evandromyia*.

Figura 1 – Área de estudo, Corumbá, Mato Grosso do Sul.

Ponto verde: local de coleta de espécimes selvagens de *Lu. cruzi* para obtenção de F₁.

Figura 2 – Gaiola de náilon utilizada para o xenodiagnóstico em cães.

A: vista em planta; B: vista lateral; C: visão tridimensional, pontos 1-2 e 3-4 são ligados por zíper de metro com curso de abertura duplo que permite manuseio pelo lado de fora e de dentro da gaiola.

Figura 3 – Barraca utilizada para experimentos de atratividade humana e canina aos flebotomíneos.

A: vista frontal, número 1 indica o dispositivo (cano PVC 1000 mm telado) para saída de ar e 2 indica o dispositivo (cano PVC 1000 mm telado) para entrada de ar com *cooler* [não mostrado na figura] para ajuste de velocidade; B: vista em planta da barraca.

Figura 4 – Promastigota de *L. (L.) amazonensis* corada a partir do conteúdo residual presente em lâmina após dissecação de fêmea infectada.

Nota: amplificação de 100x.

Figura 5 – Digestão de produtos amplificados da região ITS1 de *Leishmania* com a enzima de restrição *HaeIII*.

1: marcador ladder de 100 pb; 2: controle negativo; 3 – 10: amostra de flebotomíneos alimentados em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*; 11 – 14: amostra de flebotomíneos alimentados em cão infectado com *L. (L.) infantum*; 15: controle positivo *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); 16: controle positivo *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46); 17: amostra não digerida pela *HaeIII*; 18: marcador ladder de 100 pb.

Figura 6 – Estimativas de sobrevida pelo estimador Kaplan-Meier para os grupos de fêmeas alimentadas, não alimentadas, infectadas e não infectadas das coortes expostas aos cães (A) e aos hamsters (B).

Ingurg: ingurgitada (alimentada durante xenodiagnóstico); PCR: reação em cadeia da polimerase para detecção de DNA de *Leishmania*.

4.3 ARTIGO 3:

Infecção natural de *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* em área endêmica para leishmaniose visceral, Corumbá, região urbana do Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil

E. F. Oliveira, A. E. Casaril, N. L. F. Mateus, E. T. Oshiro, P. G. Murat, W. S. Fernandes, A. G. Oliveira, E. A. B. Galati

Artigo a ser submetido à publicação.

RESUMO

Protozoários do gênero *Leishmania* representam um grupo importante de parasitas de importância médica. Estudos de investigação da infecção natural em flebotomíneos capturados em áreas endêmicas ou não podem ser úteis como indicadores de mudanças na intensidade da transmissão de *Leishmania*. O objetivo deste estudo é pesquisar a infecção natural de flebotomíneos selvagens capturados no Município de Corumbá, entre outubro de 2012 e março de 2014, por meio da dissecação e análise molecular para pesquisa de flagelados e de DNA de *Leishmania*, respectivamente. A taxa de infecção total (considerando todas as espécies de flebotomíneos avaliadas) foi de 0,69%. O parasito identificado em todos os exemplares infectados naturalmente foi *Leishmania* (L.) *amazonensis*, sendo este o primeiro relato de *Lu. cruzi* infectado pelo parasito. A complexidade epidemiológica da leishmaniose (cutânea ou visceral) cuja etiologia é atribuída a *L. (L.) amazonensis* destaca a importância da adoção de medidas específicas de acordo com a área de ocorrência visando à redução da exposição da população humana ao vetor. Adicionalmente, pesquisas para a identificação de hospedeiros reservatórios também devem ser realizados.

INTRODUÇÃO

A urbanização da população e, paralelamente, a transformação do eminente caráter rural das leishmanioses em concomitante transmissão urbana ou periurbana, com a adaptação de algumas espécies de flebotomíneos a ambientes urbanos, são

condições que contribuíram para o aumento da incidência da doença observado nas últimas décadas no Brasil (GONTIJO; MELO, 2004; LAINSON e RANGEL, 2005; TAUIL, 2006). No Estado de Mato Grosso do Sul, de acordo com o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), entre janeiro de 1999 e dezembro de 2014 foram confirmados 3.245 casos humanos de leishmaniose visceral e 3.188 de leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2015a,b). Neste Estado, no Município de Corumbá, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) tem sido apontado por alguns autores como provável vetor de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (sin. sênior de *Leishmania infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937), devido ao encontro prévio de fêmeas com formas flageladas do parasito (SANTOS et al., 1998) e a evidências ecológicas e epidemiológicas (GALATI et al., 1997). Portanto, a participação deste flebotomíneo na cadeia de transmissão de *Leishmania* não dever ser subestimada.

Estudos de investigação da infecção natural em insetos vetores podem ser úteis como indicadores de mudanças na intensidade da transmissão de *Leishmania* Ross, 1903, bem como para a compreensão da ecoepidemiologia das leishmanioses, sendo essenciais para que as autoridades locais em saúde possam adotar medidas preventivas e avaliar o efeito dos programas de controle sobre a transmissão dessas parasitoses (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006; MICHALSKY et al., 2002).

A alta sensibilidade e especificidade independentemente do número, forma evolutiva e local do parasita no flebotomíneo (PEREZ et al., 1994; PITA-PEREIRA et al., 2005), são vantagens que justificam o uso de métodos moleculares em estudos cujo objetivo está orientado ao melhor entendimento da epidemiologia das leishmanioses e à competência vetorial de diferentes espécies de flebotomíneos (ARANSAY et al., 2000; PERRUOLO et al., 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais amplamente utilizada na análise de amostras entomológicas de diversas regiões geográficas (ARANSAY et al., 2000; CABRERA et al., 2002; CÓRDOBA-LANÚS et al., 2006; FELICIANGELI et al., 1994; SILVA e GRUNEWALD, 1999; PAIVA et al., 2007), por ser uma ferramenta de maior sensibilidade e especificidade na detecção e identificação de *Leishmania* (SCHONIAN et al., 2003; MANNA et al., 2004). Assim, o presente estudo tem por objetivo investigar infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos coletados no Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de flebotomíneos

Os espécimes utilizados neste trabalho foram capturados durante estudos prévios (CASARIL et al., 2014; OLIVEIRA et al., artigo 5 a ser submetido à publicação) realizados entre abril de 2012 e março de 2014 no perímetro urbano do Município de Corumbá (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" O; 118 m. a. n. m), que está localizado na porção noroeste do Estado de Mato Grosso do Sul, na região do Pantanal Sul-mato-grossense e faz fronteira com a Bolívia. O município possui área total estimada de 64.962,8 km², o que representa 18,19% da extensão territorial do Estado.

Cinco pontos de coleta foram amostrados por conveniência em bairros com notificações de casos humanos de leishmaniose visceral no ano anterior ao início do estudo, sendo quatro residências na região periférica e uma na área central.

Armadilhas luminosas automáticas foram instaladas semanalmente na área peridomiciliar das cinco residências selecionadas. Todas as fêmeas capturadas nos seis primeiros meses foram clarificadas para a identificação de acordo com GALATI (2003). Portanto, a investigação da infecção natural foi realizada nos espécimes capturados de outubro de 2012 a março de 2014. Adicionalmente, exemplares que não foram possíveis de identificar somente pela espermoteca foram clarificadas e, junto com as fêmeas ingurgitadas, não foram incluídas neste estudo. Nos seis primeiros meses de análise (outubro/2012 a março/2013) as fêmeas foram agrupadas em *pools* de até dez insetos, de acordo com a espécie, local e data de coleta. As demais foram acondicionadas individualmente em microtubos de 1,5 mL com isopropanol e armazenadas sob refrigeração de -20 °C para serem submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

Além das fêmeas capturadas durante as coletas regulares, uma amostra de 126 fêmeas foi dissecada de acordo com JOHNSON et al. (1963). Estes exemplares foram capturados por aspiração em um galinheiro (mesmo local de coleta com armadilhas luminosas localizado no bairro Maria Leite) durante três noites, das 19:00 às 21:00 h. Após expor o intestino e as espermotecas das fêmeas para a pesquisa de flagelados e identificação da espécie, o conteúdo da lamínula (tubo digestivo, tórax e cabeça) foi transferido e armazenado em microtubos de 1,5 mL com

isopropanol a – 20 °C para a realização da PCR. *Pools* de até dez espécimes foram realizados para as fêmeas negativas ao exame direto para pesquisa de flagelados.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Para a extração do DNA, os espécimes foram triturados com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 mL com 300 µL da solução de resina *Chelex®* (Bio-Rad, Hercules, USA) a 5%. A solução foi misturada em vortex por 15 seg e centrifugada por 60 seg a 13000 rpm. Em seguida, a mistura colocada em banho-maria a 80 °C por 30 min. Decorrido este tempo, os procedimentos de mistura em vortex e centrifugação foram repetidos para a posterior retirada e transferência do sobrenadante para outro microtubo estéril. O produto da extração foi acondicionado sob refrigeração de – 20 °C.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pares de base (pb) de *Leishmania*. Para um volume final de 25 µL de reação foram adicionadas 5 µL de amostra, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 5,5 µL de água e 1 µL de cada oligonucleotídeo: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (EL TAI et al., 2000).

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 1 minuto, com pós-extensão a 72 °C por 5 min, em termociclador (BIOER, Hangzhou, CHN). Como controles negativos da reação foram utilizados uma reação sem DNA contendo água e DNA de fêmeas F1 não alimentadas, e como controle positivo os DNA de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de cultura.

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 1,5% em 100 mL de Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e submetidos à corrida eletroforética a 100 v por 100 min em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) concentrado. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Os produtos das amostras positivas foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *HaeIII* (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5', para identificar a espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al. 2003). Foi adicionado 1 µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima *HaeIII*, 1 µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C 'overnight'. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 2%, com tampão TBE por 2 h.

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Uso Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob protocolo CEUA-491/2013 e o grupo de estudo possui Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: SISBio 25952-1).

RESULTADOS

Entre abril de 2012 e março de 2014, durante as coletas semanais com armadilhas luminosas, foram coletados 2.292 fêmeas de flebotomíneos. Destas, 1.038 foram utilizadas para a investigação da infecção natural por *Leishmania* pela PCR. Outras 126 fêmeas foram coletadas por aspiração e dissecadas para a pesquisa de flagelados, totalizando 1.164 observações. Os espécimes analisados pertencem a seis gêneros distribuídos em 12 espécies: *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Evandromyia cortelezii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia aldafalcaoae* (Santos, Andrade Filho & Honer, 2001), *Evandromyia corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989), *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1940), *Evandromyia walkeri* (Newstead, 1914), *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia forattinii* Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985, *Micropygomyia peresi* (Mangabeira, 1942), *Martinsmyia oliveirai* (Martins, Silva & Falcão, 1970) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), conforme apresentado na tabela 1.

Apenas oito fêmeas de *Lu. cruzi* analisadas individualmente apresentaram banda de DNA compatível com *Leishmania* (300 pb), o que representou uma taxa de infecção natural de 0,69% (8/1.164). Todos os espécimes encontrados com infecção natural foram capturados na mesma noite em uma única armadilha, instalada no bairro Maria Leite no mês de julho de 2013.

Considerando somente os espécimes de *Lu. cruzi*, a taxa de infecção foi de 0,89% (8/903). A identificação específica do parasito foi realizada pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (ITS1 PCR-RFLP) por meio da digestão com enzimas de restrição *HaeIII*. O parasito identificado em todos os produtos amplificados foi *L. (L.) amazonensis* (200 e 140 pb) (Figura 1).

Com relação às 126 fêmeas dissecadas para a pesquisa de flagelados, todas foram negativas em ambas as metodologias para a investigação de infecção natural por *Leishmania*.

DISCUSSÃO

Coletas regulares de flebotomíneos auxiliam na compreensão e conhecimento da distribuição mensal e de outros fatores que possam influenciar a abundância num dado local e período de tempo. Adicionalmente, inquéritos periódicos para a detecção de infecção natural por *Leishmania* são importantes para o entendimento de componentes da cadeia de transmissão do parasito, uma vez que o encontro de flebotomíneos naturalmente infectados, exceto se vetor comprovado, demonstra a necessidade de estudos para a investigação da competência vetorial e para a identificação de vetores permissivos (KAMHAWI, 2006; PAIVA et al., 2007).

A incriminação e a posterior comprovação de uma espécie como vetora de *Leishmania* devem ser realizadas com base em diversos critérios, sendo o primeiro deles o encontro de fêmeas selvagens infectadas naturalmente pelo flagelado (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK; WARD, 1981) em mais de uma ocasião e o isolamento e tipagem de promastigotas a partir de fêmeas não alimentadas recentemente (menos de 36 h) (READY, 2013).

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a detecção de infecção natural em insetos hematófagos, com diferentes graus de sensibilidade e especificidade, como a dissecação para pesquisa direta de flagelados, seguida da inoculação em modelos animais experimentais e o isolamento do parasito em meio de cultura a

partir de insetos dissecados (DEANE, 1956; LAINSON et al., 1985; SHERLOCK, 1996). Entretanto, além de laboriosos, esses métodos dependem da experiência do profissional, e, em alguns casos, são altamente suscetíveis à contaminação (PITA-PEREIRA et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 1994; TESH e MODI, 1984). Ainda deve ser considerado o fato de que as formas flageladas observadas ao exame microscópio, seja pela dissecação ou pelo isolamento em meios de cultura, são indistinguíveis entre as espécies (SHAW e LAINSON, 1987).

Por isso, abordagens moleculares estão sendo cada vez mais empregadas em estudos epidemiológicos de infecção natural em insetos vetores (RANASINGHE et al., 2008). Deste modo, a reação em cadeia da polimerase, embora apresente custo elevado em comparação a outras metodologias, apresenta-se como uma ferramenta prática com elevada sensibilidade e especificidade, além da possibilidade de agrupamento de indivíduos em *pools* (PAIVA et al., 2006; SAVANI et al., 2009; SCHONIAN et al., 2003). No entanto, a taxa de infecção natural quando analisada em *pools* pode ser subestimada, uma vez que não é possível identificar quantos espécimes estavam realmente infectados. Nestes casos, o cálculo da taxa mínima de infecção (PAIVA et al., 2006, 2010) e a estimativa da prevalência de infecção por meio de um algoritmo (KATHOLI et al., 1995; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006) têm sido empregados. Além da PCR convencional qualitativa, a PCR em tempo real, por ser mais rápida e produzir dados quantitativos passíveis de análises estatísticas, também tem sido utilizada (RANASINGHE et al., 2008).

Estudos conduzidos em diversas localidades sobre infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* têm demonstrado baixas taxas, independente da metodologia adotada, mesmo regiões endêmicas (MAIA et al., 2013; MICHALSKY et al., 2011; PAIVA et al., 2006, 2007). Neste estudo, considerando o total de espécies, a taxa de infecção foi de 0,69% e de 0,89% para *Lu. cruzi*. Não foram observadas formas flageladas nos espécimes dissecados e a PCR mostrou-se negativa para todos os *pools* analisados neste grupo.

Embora *Lu. cruzi* ainda seja pouco estudada, SANTOS et al. (1998) descreveram uma taxa de infecção de 0,39% baseada na dissecação de 3.575 espécimes de *Lu. cruzi*. Outros 1.013 flebotomíneos pertencentes a sete espécies foram dissecados sem o encontro de formas flageladas. Com base nestes achados, os autores incriminaram a espécie como vetor de *L. (L.) infantum* no Município de Corumbá (SANTOS et al., 1998). Posteriormente, no mesmo município, PITA-

PEREIRA et al. (2008) relataram uma taxa mínima de infecção de *Lu. cruzi* por *L. (L.) infantum* de 1,5% ao utilizarem a região do minicírculo do kDNA como alvo da PCR multiplex. Este marcador apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* (BRUIJIN e BARKER, 1992; FREITAS-LIDANI, 2014; SMYTH et al., 1992). Entretanto, a região do minicírculo do kDNA possibilita apenas a identificação do gênero do parasita (SCHONIAN et al., 2003).

A correta caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção natural é de extrema importância tanto em regiões não endêmicas, onde qualquer espécie do parasita poderia ser importada, quanto em áreas endêmicas, onde diferentes espécies de importância clínica e epidemiológica podem estar presentes (MICHALSKY et al., 2002; SCHONIAN et al., 2003). Portanto, neste trabalho optou-se pela região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) como alvo na PCR pela vantagem da possível diferenciação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção natural, critério de grande importância no estudo da epidemiologia e na definição de possíveis medidas de controle envolvendo as leishmanioses (ACARDI et al., 2010; SCHONIAN et al., 2003). Além disso, a possibilidade de amplificação de DNA de outros tripanossomatídeos foi descartada com a utilização deste alvo (EL TAI et al., 2000).

Lu. cruzi também tem sido encontrado infectado naturalmente por *L. (L.) infantum* em outras regiões, com taxa mínima de infecção de 6,10% (BRITO et al., 2014) e de um *pool* positivo entre três analisados, com dez espécimes cada um (MISSAWA et al., 2011), no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, que dista cerca de 871 km de Corumbá.

Para *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), vetor comprovado de *L. (L.) infantum* e espécie filogenicamente próxima a *Lu. cruzi*, muitos autores têm relatado taxas de infecção por *Leishmania* inferiores a 10% usando diferentes metodologias (ACARDI et al., 2010; DEANE, 1956; LAINSON et al., 1985; MIRANDA et al., 2002; MISSAWA et al., 2010; PAIVA et al., 2006, 2010; SANAVI et al., 2009; SHERLOCK, 1996; SILVA et al., 2008; SANT'ANNA et al., 2008). O primeiro relato de *Lu. longipalpis* com infecção natural por *L. (L.) amazonensis* ocorreu no Município de Antônio João, localizado na porção sudoeste do Estado de Mato Grosso do Sul e na fronteira com o Paraguai (PAIVA et al., 2006). Posteriormente, outros autores também descreveram o encontro de *Lu. longipalpis* infectado naturalmente pelo

mesmo parasito no Município de Bonito (SAVANI et al., 2009). Estas duas localidades, Antônio João e Bonito, são áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina e cutânea, respectivamente.

Este é o primeiro relato de infecção natural de *Lu. cruzi* por *L. (L.) amazonensis* e da presença deste parasito no Município de Corumbá. Como observado para *Lu. longipalpis*, é possível que *Lu. cruzi* também apresente caráter permissivo e suporte a infecção por outras espécies de *Leishmania*, sugerindo que o mecanismo de adesão do parasito via lipofosfoglicanos (LPG) não é espécie-específico ou ainda possa ocorrer por outros mecanismos (VOLF e MYSKOVA, 2007). Estes fatos representam importantes implicações para a transmissão e evolução do parasita, uma vez que podem contribuir para a dispersão de *Leishmania* devido à sua adaptação em novos vetores (MYSKOVA et al., 2007), uma vez que o principal vetor de *L. (L.) amazonensis*, *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), não tem sido descrito na região (CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1985, 1997; SANTOS et al., 1988). Outro fator importante foi o encontro de um roedor do gênero *Dasyprocta*, considerado hospedeiro secundário de *L. (L.) amazonensis* (ASHFORD, 2000; LAINSON et al., 1994; LAINSON e SHAW, 2005), no local onde os espécimes infectados foram coletados.

A ocorrência de *L. (L.) amazonensis* tem sido registrada na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai. No Brasil, encontra-se presente em todas as regiões, com destaque para a Região Amazônica. No entanto, é provável que sua distribuição geográfica seja mais ampla que a conhecida e que o parasita também ocorra em outros países da América do Sul, onde o vetor flebotomíneo é encontrado (BRASIL, 2007; GRIMALDI et al., 1989; LAINSON e SHAW, 1987, 2005).

Devido a sua complexidade epidemiológica, a leishmaniose (cutânea ou visceral) cuja etiologia é atribuída a *L. (L.) amazonensis* caracteriza-se como uma doença de difícil controle, necessitando de medidas específicas de acordo com a área de ocorrência. Portanto, além do estabelecimento do diagnóstico e tratamento precoces, a correta identificação da espécie de *Leishmania* e a delimitação da área de abrangência são essenciais para o planejamento e adoção de medidas preventivas, bem como para a redução da exposição da população humana ao vetor (BRASIL, 2007; DORVAL et al., 2006).

Estudos adicionais de infecção experimental com ambas as espécies estão sendo desenvolvidos por este grupo de pesquisa e são necessários para a melhor

compreensão da interação parasito-vetor. Paralelamente, pesquisas para a identificação de hospedeiros reservatórios também devem ser realizados, uma vez que diversos mamíferos silvestres e domésticos são considerados hospedeiros de diferentes espécies de *Leishmania* (ASHFORD, 2000).

REFERÊNCIAS

ACARDI, S. A., LIOTTA, D. J., SANTINI, M. S., ROMAGOSA, C. M., SALOMÓN, O. C. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 796-799, 2010.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, 1269-1281, 2000.

ARANSAY, A. M., SCOULICA, E., TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1933-1938, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Leishmaniose Visceral - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>>. Acesso em: fevereiro de 2015, 2015a.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/ita/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: fevereiro de 2015, 2015b.

BRITO, V. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C. O.; SOUSA, V. R. F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899–904, nov. 2014.

BRUIJIN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnoses of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

CABRERA, O. L., MUNSTERMAN, L. E., CÁRDENAS, R., GUTIÉRREZ, R., FERRO, C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. **Biomédica**, v. 22, n. 3, p. 296-302, 2002.

CASARIL, A. E.; MONACO, N. Z. N.; OLIVEIRA, E. F.; EGUCHI, G. U.; PARANHOS FILHO, A. C.; PEREIRA, L. E.; OSHIRO, E. T.; GALATI, E. A. B.; MATEUS, N. L. F., OLIVEIRA, A. G. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 364, 2014.

CÓRDOBA-LANÚS, E., DE GROSSO, M. L., VALLADARES, B.; SALOMÓN, O. D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 98, n. 1, p. 1-5, 2006.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brasil, 1956, 162 pp.

DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CAMARGO DE CASTRO, A. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 43-46, 2006.

EL TAI, N.O; OSMAR, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.H.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

FELICIANGELI, M. D., RODRIGUEZ, N., BRAVO, A., ARIAS, F., GUZMAN, B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-Central Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 8, n. 4, p. 317-324, 1994.

FREITAS-LIDANI, K. C.; MESSIAS-REASON, I. J.; ISHIKAWA, E. A. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 442-447, 2014.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-51.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B.; REGO JÚNIOR, F. A.; NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T. Fauna flebotomínica do município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de

Lutzomyia forattinii, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, n.2, p. 261-266, 1985.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro clínico, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KATHOLI, C. R.; TOE, L.; MERRIWEATHER, A.; UNNASCH, T. R. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R. D. Ecology of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 82, p. 143-152, 1981.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology**. 10 ed. London: Hodder Arnold ASM Press, 2005. p. 313-49.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonian. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R. S. M.; SILVEIRA, F. T. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 223-226, 1985.

MAIA, C.; DIONÍSIO, L.; AFONSO, M. O.; NETO, L.; CRISTÓVÃO, J. M., CAMPINO, L. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 481-487, 2013.

MANNA, L. F., VITALE, S., REALE, S., CARACAPPA, L. M., PAVONE, R., DELLA MORTE, G., CRINGOLI, N., STAIANO & GRAVINO, A. Comparison of different tissue sampling for PCR based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARTIN-SÁNCHEZ, J.; GÁLLEGO, M.; BARÓN, S.; CASTILLEJO, S.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n. 6, p. 527-532, 2006.

MICHALSKY, E. M., FORTES-DIAS, C. L., PIMENTA, P. F., SECUNDINO, N. F., DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES, K. S.; SILVA, F. O. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 58-62, 2011.

MIRANDA, J. C., E, REIS, A., SCHRIEFER, M., GONÇALVES, M. G., REIS, L., CARVALHO, O., FERNANDES, M., BARRAL-NETTO, A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 185-188, 2002.

MISSAWA, N. A., MICHALSKY, E. K., FORTES-DIAS, C. L., DIAS, E. S. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2414- 2419, 2010.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia crluzi* no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MYSKOVA, J.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, S. M.; VOLF, P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 317-324, 2007.

SANT'ANNA, M. R. V.; JONES, N. G.; HINDLEY, J. A.; MENDES-SOUSA, A. F.; DILLON, R. J.; CAVALCANTE, R. R.; ALEXANDER, B.; BATES, P. A. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**, v. 107, n. 3, p. 230-237, 2008.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 343-348, 2008.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONT, R.S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 126-130, 2010.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; MALAFRONT, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PAIVA, B. R., SECUNDINO, N. F. C., PIMENTA, P. F. P., GALATI, E. A. B., NADRADE JUNIOR, H. F., MALAFRONT, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 87-94, 2007.

PEREZ, J.E., OGUSUKU, E., INGA, R., LOPEZ, M., MONJE, J. PAZ L., NIETO, E., AREVALO, J., GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 161-164, 1994.

PERRUOLO, G., NORIS RODRÍGUEZ, N., FELICIANGELI, M.D. Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from *Lutzomyia spinicrassa* (species group *Verrucarum*) Morales Osorno Mesa, Osorno and Hoyos 1969, in the Venezuelan Andean region. **Parasite**, v.13, n. 1, p. 17-22, 2006.

PITA-PEREIRA D., ALVES, C. R., SOUZA, M. B., BRAZIL, R. P., BERTHO, A. L., DE FIGUEIREDO BARBOSA, A., BRITTO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of

visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M. E.; HAMILTON, J. G.C.; BATES, P. A.; MAINGON, R. D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 9, p. 875-882, 2008.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013.

RODRIGUEZ, N., GUSMAN, B., RODAS, A., TAKIFF, H., BLOOM, B. R., CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasite by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2246- 2252, 1994.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SCHÖNIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWYNOCH, C.; SCHALLIG, HDFH; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: new world. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The leishmaniasis in biology and medicine**. v. I. Orlando: Academic Press; 1987. p. 291-363.

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVA, O. S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 579-582, 1999.

SMYTH, A. J.; GGHOSH, A.; HASSAN, M. D. Q.; BASU, D.; BRUIJIN, M.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p. 183-192, 1992.

TESH, R. B.; MODI, G. B. A simple method for experimental infection of phlebotominae sand flies with *Leishmania*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 41-46, 1984.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **TRENDS in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 91-92, 2007.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275-277, 2006.

Tabela 1 – Distribuição de fêmeas utilizadas para pesquisa de infecção natural por *Leishmania*, segundo espécie e forma de análise.

Espécie	N (%)	Forma de análise	
		Individual	Pool (número de pools)
<i>Br. brumpti</i>	1 (0,09)	1	...
<i>Ev. aldafalcaoae</i>	3 (0,26)	3	...
<i>Ev. cortelezii</i>	3 (0,26)	3	...
<i>Ev. corumbaensis</i>	95 (8,16)	91	4 (2)
<i>Ev. sallesi</i>	11 (0,95)	11	...
<i>Ev. walkeri</i>	1 (0,09)	1	...
<i>Lu. cruzi</i>	903* (77,58)	569	334 (57)
<i>Lu. forattinii</i>	133 (11,43)	133	...
<i>Mi. peresi</i>	1 (0,09)	1	...
<i>Mt. oliveirai</i>	10 (0,86)	10	...
<i>Sc. sordellii</i>	3 (0,26)	3	...
Total	1.164 (100,00)	826	338 (59)

*Do total de 903 fêmeas de *Lu. cruzi*, 126 foram dissecadas para a pesquisa de flagelados.

Figura 1 – Digestão de produtos amplificados da região ITS1 de *Leishmania* com a enzima de restrição *HaeIII*.

1: marcador ladder de 100 pb; 2: controle negativo; 3 – 10: amostra de flebotomíneos selvagens naturalmente infectados com *L. (L.) amazonensis*; 11: amostra negativa de flebotomíneos selvagem; 12: controle positivo *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); 13: amostra não digerida pela *HaeIII*; 14: marcador ladder de 100 pb.

4.4 ARTIGO 4:

Transmissão experimental e natural de *Leishmania* spp. via picada de *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae) para hamster

E. F. Oliveira, E. T. Oshiro, W. S. Fernandes, A. G. Oliveira, E. A. B. Galati

Artigo a ser submetido à publicação.

RESUMO

A competência vetorial de flebotomíneos para parasitos do gênero *Leishmania* Ross, 1903, deve sempre ser avaliada na presença de outros fatores que sustentam sua participação na transmissão do parasito. Dentre os diversos flebotomíneos encontrados infectados naturalmente, poucos têm sido utilizados em estudos de infecção e transmissão, natural ou experimental. *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) tem sido apontado como o provável vetor de *Leishmania* (L.) *infantum* Nicolle, 1908 (sin. sênior de *L. (L.) infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937) em algumas cidades brasileiras sem que estudos mais aprofundados tenham sido realizados. Considerando este fato, este trabalho se propôs a demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *Leishmania* por meio da transmissão experimental e natural do parasito via picada do inseto. Os resultados obtidos permitiram comprovar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *Leishmania* (L.) *infantum* e *Leishmania* (L.) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 a partir da transmissão natural e experimental para hamsters, respectivamente.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um complexo de doenças com variado espectro clínico e diversidade epidemiológica, configurando-se como um crescente agravo de saúde pública, não somente no Brasil, onde são consideradas endêmicas, mas em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano (ALVAR et al., 2012; READY, 2014; WHO, 2010).

A diversidade clínica e epidemiológica dessas doenças varia de acordo com a localidade e com os componentes envolvidos na cadeia de transmissão de *Leishmania* Ross 1903: inseto vetor, hospedeiros/reservatórios e o próprio parasito (LAINSON e SHAW, 1987, 2005).

Diversos flebotomíneos têm sido encontrados naturalmente infectados por *Leshmania*. No entanto, para poucos têm sido divulgados estudos relativos aos aspectos envolvidos na interação parasito-inseto e na capacidade e competência vetorial (CASANOVA et al., 2009). Estudos ecológicos conduzidos em alguns municípios brasileiros têm sugerido que *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) seja o responsável pela transmissão de *Leishmania* (L.) *infantum* Nicolle, 1908 (sin. sênior de L. (L.) *infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937) devido ao encontro de infecção natural (BRITO et al., 2014; MISSAWA et al., 2011; PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998), a elevada densidade populacional e a distribuição coincidente com casos humanos da parasitose (GALATI et al., 1997; MISSAWA et al., 2011; SANTOS et al., 1998).

Considerando que a demonstração da competência vetorial de determinada espécie de flebotomíneo é um dos critérios necessários à incriminação e comprovação de uma espécie como vetora de *Leishmania* (READY, 2013; KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK; WARD, 1981), pesquisas com este enfoque são necessários para a elucidação dos componentes (vetores, reservatórios hospedeiros e parasitos) envolvidos na eco-epidemiologia da doença. Portanto, este estudo se propôs a demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *Leishmania* por meio da transmissão experimental e natural do parasito via picada do inseto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

Os espécimes de *Lu. cruzi* utilizados neste estudo são provenientes da área urbana do Município de Corumbá, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. (19°00'33" S; 57°39'12" O; 118 m. a. n. m), que está localizado na porção noroeste do Estado de Mato Grosso do Sul. A cidade possui área total estimada de 64.962,8 km², o que representa 18,19% da extensão territorial do Estado e está situada a 415 km da capital Campo Grande, na região do pantanal sul-mato-grossense, fazendo fronteira

com a Bolívia. As coletas foram realizadas em galinheiros localizados no peridomicílio de duas residências localizadas nos bairros Maria Leite (19°00'45" S; 57°37'31" O) e Nova Corumbá (19°02'47" S; 57°39'21" O).

Transmissão experimental de *Leishmania* spp.

Na tentativa de demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* por meio da transmissão experimental de *Leishmania* sp., fêmeas F1 obtidas de colônia mantida em laboratório foram utilizadas em experimentos de infecção experimental (xenodiagnóstico) em cães e em hamster infectados naturalmente com *Leishmania* (L.) *infantum* e experimentalmente com *Leishmania* (L.) *amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (IFLA/BR/1967/PH8), respectivamente, conforme descrito por OLIVEIRA et al. (artigo 2 a ser submetido à publicação).

Foram realizadas nove tentativas de infecção experimental de *Lu. cruzi* pelo xenodiagnóstico, sendo seis em cães e três em hamsters. Em quatro experimentos, um realizado em cão e os demais em hamsters, foi possível obter a infecção experimental dos flebotomíneos. Nestas ocasiões, hamsters limpos foram expostos às fêmeas sobreviventes um dia após a identificação do período de incubação extrínseco (três dias) em relação ao parasito, ou seja, do tempo em dias para o aparecimento de formas promastigotas metacíclicas no intestino anterior e/ou na região anterior do intestino médio (torácico). Como este período foi de três dias, a tentativa de transmissão do parasito ocorreu no quarto dia após o xenodiagnóstico. Nos outros cinco experimentos, a exposição dos hamsters limpos aos flebotomíneos que se alimentaram em hospedeiros infectados ocorreu no sétimo dia após o xenodiano diagnóstico. Os animais utilizados eram jovens com 30 a 40 dias de vida, de ambos os sexos. Todas as tentativas de transmissão experimental do parasito foram realizadas em gaiolas de náilon com armação metálica (30 x 30 cm) que foi coberta com tecido escuro, sempre das 18:00 às 19:00 h.

Transmissão natural de *Leishmania* spp.

Durante março de 2013 a dezembro de 2014 fêmeas selvagens de flebotomíneos foram capturadas para a manutenção de colônia de *Lu. cruzi* e para fornecer as fêmeas de primeira geração (F₁) que foram utilizadas nos experimentos

de infecção experimental. Os exemplares foram capturados em galinheiros localizados no peridomicílio de duas residências com auxílio de armadilha luminosa tipo CDC, ou por aspiração direta nas galinhas ou ainda em barraca de Shannon preta. Para o repasto sanguíneo dos espécimes, os insetos foram transferidos para gaiolas de náilon com armação metálica (30 x 30 cm) coberta com tecido escuro, onde um hamster anestesiado (xilazina e ketalar em dosagem adequada ao peso) foi oferecido como fonte alimentar durante uma hora, após o término das coletas. Ao todo, 12 animais jovens com 30 a 90 dias de vida, de ambos os sexos, foram utilizados para alimentar fêmeas selvagens. Destes, quatro foram utilizados em duas ocasiões, ou seja, em dois meses, e os demais em apenas uma.

Manutenção e exame dos animais

Todos os animais expostos às picadas de insetos, infectados ou não, foram mantidos em segurança em rack ventilado equipado com mini isoladores, em caixas próprias (gaiolas) com serragem autoclavada, ração e água *ad libitum*. Semanalmente, as gaiolas eram limpas e os animais examinados fisicamente quanto ao estado geral (emagrecimento, integridade da pele e alteração na pelagem). O seguimento máximo para avaliar a possível infecção por *Leishmania* durou seis meses. Na presença de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*, este seguimento foi interrompido. Após este tempo, os hamsters foram submetidos à eutanásia com dióxido de carbono e necropsiado para a retirada do baço e de fragmentos de pele, que foram utilizados para a confecção de esfregaços por aposição (imprint) corados pela técnica de Giemsa, para a semeadura em meio de cultura e para a pesquisa de DNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes últimos foram transferidos para microtubos e mantidos a -20 °C.

Isolamento do parasito e análise molecular

Para o isolamento do parasito, os fragmentos obtidos a partir da necropsia foram semeados em meio artificial NNN (Neal, Novy, Nicolle) com fase líquida de meio Schneider (*Schneider's Insect Medium*, Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab®) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma), mantidos a

25°C em câmara de incubação. Para a pesquisa de formas promastigotas, as culturas foram examinadas semanalmente durante quatro semanas consecutivas a partir do sétimo dia.

A análise molecular dos fragmentos e das culturas, quando positivas, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a identificação do parasito pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o Wizard DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pares de base (pb) de *Leishmania*. Para um volume final de 25 µL de reação foram adicionadas 5 µL de amostra, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 5,5 µL de água e 1 µL de cada oligonucleotídeo: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (EL TAI et al., 2000).

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 53°C por 30 seg, 72°C por 1 min, com pós-extensão a 72°C por 5 min, em termociclador (BIOER, Hangzhou, CHN). Como controles negativos da reação foram utilizados uma reação sem DNA contendo água e DNA de fêmeas F1 não alimentadas, e como controle positivo os DNA de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) extraídos de cultura.

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 1,5% em Tris-Borato de EDTA (TBE), corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e submetidos à corrida eletroforética a 100 v por 100 min em tampão TBE. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

Os produtos das amostras positivas foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *HaeIII*, que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5', para identificar a espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al. 2003). Foi adicionado 1 µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima *HaeIII*, 1 µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a

37°C 'overnight'. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por 3 h.

RESULTADOS

Transmissão experimental de *Leishmania* spp.

No total, nove hamsters limpos e sadios foram expostos às fêmeas de *Lu. cruzi* alimentadas em hospedeiros infectados: seis com fêmeas provenientes do xenodiagnóstico em cães e três dos experimentos em hamsters infectados experimentalmente. Destes nove animais, um morreu 22 dias após ser exposto às 21 fêmeas alimentadas em hamster infectado com *L. (L.) amazonensis*. Os demais animais foram eutanasiados e necropsiados ao completarem seis meses a partir da data de exposição.

A taxa de alimentação no segundo repasto foi de 67,57 e 34,15%, para o grupo de fêmeas alimentadas em cães infectados com *L. (L.) infantum* e em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. Destes percentuais, 52,00 e 57,14% das fêmeas estavam infectadas, nesta ordem, pelos parasitas em questão.

Em apenas um animal foi possível demonstrar competência vetorial de *Lu. cruzi* a partir da transmissão experimental de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 1). O animal cuja transmissão experimental foi bem sucedida foi o único que morreu antes dos seis meses preconizados. Por este motivo, não foi possível semear fragmentos de tecido (baço) em meio de cultura para isolamento do parasito. No entanto, foi possível observar formas amastigostas ao exame parasitológico direto (*imprint* do baço) (Figura 1A), bem como detectar DNA de *Leishmania* na PCR. A PCR-RFLP confirmou a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Ao exame físico, este animal não apresentava sintomatologia específica atribuída à infecção por *Leishmania*. Entre as 21 fêmeas utilizadas na tentativa de transmissão do parasito neste animal, apenas seis realizaram o segundo repasto sanguíneo, sendo que três estavam infectadas pelo parasita. Os demais animais apresentaram exames negativos nas três metodologias adotadas (exame parasitológico direto, isolamento em cultura e PCR). Portanto, não foi possível demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* a partir da transmissão experimental.

Transmissão natural de *Leishmania* spp.

Durante o período de coleta de flebotomíneos selvagens, 12 hamsters foram utilizados como fonte de alimentação sanguínea para as fêmeas capturadas no campo. A taxa média de fêmeas alimentadas foi de 40,10%. Como estas fêmeas eram destinadas à manutenção da colônia de flebotomíneos, a identificação delas foi realizada após a postura de ovos e morte, por meio de clarificação. Portanto, não foram dissecadas para pesquisa de flagelados e nem submetidas à análise molecular para a pesquisa de infecção natural por *Leishmania*. Ao final do seguimento, três animais apresentaram pelo menos um exame positivo para *Leishmania* (Tabela 1).

A transmissão natural de *L. (L.) infantum* foi observada em dois animais que foram utilizados somente uma vez para alimentar fêmeas de *Lu. cruzi* capturadas manualmente em galinheiro e na barraca de Shannon preta no peridomicílio das residências localizadas nos bairros Maria Leite e Nova Corumbá, respectivamente. Ambos os animais apresentaram sinais clínicos sugestivos de infecção por *L. (L.) infantum*, como emagrecimento acentuado, ascite e esplenomegalia (Tabela 1). Um desses animais apresentou todos os exames diagnósticos positivos, enquanto o outro foi positivo apenas na PCR para a detecção do DNA de *Leishmania*. Portanto, foi possível demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para transmitir *L. (L.) infantum* a partir de fêmeas selvagens. A figura 1B apresenta o *imprint* do baço de um dos animais cuja transmissão foi bem sucedida.

O terceiro hamster foi infectado naturalmente por *L. (L.) amazonensis*. A identificação da infecção foi confirmada apenas pela análise molecular. Este animal foi utilizado para o repasto sanguíneo em duas ocasiões. No total 303 fêmeas selvagens coletadas manualmente no Bairro Maria Leite foram expostas ao roedor. Todavia, em um dos repastos havia três fêmeas de *Evandromyia corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989) e uma de *Lutzomyia forattinii* Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985. Portanto, 98,68% das fêmeas pertenciam à espécie *Lu. cruzi*. Embora o estudo de reservatórios silvestres não seja alvo deste trabalho, em uma ocasião foi observada a presença de um roedor do gênero *Dasyprocta*, considerado hospedeiro secundário de *L. (L.) amazonensis* (ASHFORD, 2000; LAINSON et al., 1994; LAINSON e SHAW, 2005), no peridomicílio onde as fêmeas foram capturadas.

DISCUSSÃO

Desde a primeira demonstração da transmissão experimental de *L. (L.) infantum* (sin. de *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas 1937) via picada de *Lu. longipalpis* criado em laboratório (LAINSON et al., 1977), muito estudos foram desenvolvidos com espécies neotropicais de *Leishmania* em combinação com diferentes espécies de flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK et al., 1977; LAINSON et al., 1987; SECONDINO et al., 2012; SHERLOCK, 1996; VEXENAT et al., 1986). No entanto, nos últimos anos têm sido poucas as pesquisas divulgadas que demonstraram a transmissão experimental ou natural de *Leishmania* (DORVAL; CUNHA, 2007; SECONDINO et al., 2012) bem como a capacidade vetorial de flebotomíneos suspeitos de participarem da transmissão do parasito (CASANOVA et al., 2009).

No presente trabalho foi possível demonstrar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* pela transmissão natural a partir de fêmeas selvagens naturalmente infectadas e pela transmissão experimental, respectivamente. Embora também tenha sido observada a transmissão natural de *L. (L.) amazonensis* a partir de fêmeas selvagens, a presença de quatro flebotomíneos de outras espécies no grupo de insetos que realizaram repasto sanguíneo no hamster que adquiriu a infecção não permite a atribuição da transmissão à *Lu. cruzi*, mesmo que haja fortes evidências, como o encontro prévio de *Lu. cruzi* naturalmente infectado pelo parasito (OLIVEIRA et al., artigo 3 a ser submetido à publicação) e a elevada densidade populacional (98,68%) em relação as demais durante a alimentação sanguínea.

Devido à ausência de trabalhos desta natureza com *Lu. cruzi*, pouco ainda se conhece a respeito da interação flebotomíneo/*Leishmania* para este díptero. A manutenção de todas as fases do desenvolvimento evolutivo do parasita observado em trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., artigo 2 a ser submetido à publicação) e a transmissão experimental de *L. (L.) amazonensis* demonstrada no presente trabalho denotam a permissividade de *Lu. cruzi* para outras espécies de *Leishmania* (VOLF e MYSKOVA, 2007). Contudo, outros estudos devem ser executados a fim de verificar este caráter do inseto.

Além de laboriosa, a transmissão experimental de *Leishmania* apresenta dificuldades relacionadas à alta mortalidade de fêmeas após a oviposição, o que

impediria o segundo repasto sanguíneo, e à concordância gonotrófica de muitas espécies que necessitam de apenas um repasto sanguíneo para a maturação dos ovários e postura dos ovos. Ainda deve ser considerada a baixa proporção de fêmeas infectadas que realizam o segundo repasto (KILLICK-KENDRICK et al., 1977). Neste estudo, as taxas médias de alimentação obtidas no segundo repasto variaram entre 67,57 e 34,15%. Embora não avaliado sistematicamente, muitas fêmeas não se ingurgitaram completamente durante a segunda refeição sanguínea, corroborando com as observações de KILLICK-KENDRICK et al. (1977) em fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas por *L. (L.) amazonensis*.

A transmissão experimental de *L. (L.) amazonensis* por picada de *Lu. longipalpis* foi inicialmente demonstrada por KILLICK-KENDRICK et al. (1977). Posteriormente, SHERLOCK (1996) também demonstrou este fato ao tentar transmitir as mesmas espécies de *Leishmania* utilizadas no presente estudo, e, de modo semelhante, não obteve êxito na transmissão experimental de *L. (L.) infantum*. Além da transmissão pelo seu vetor natural, *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) (LAINSON e SHAW, 1968; LAINSON et al., 1994), a transmissão deste protozoário tem sido demonstrada experimentalmente por outros flebotomíneos, como *Psychodopygus carrerai carrerai* (Barretto, 1946) (RYAN et al., 1987).

Alguns autores sugerem que *Lu. longipalpis* possa transmitir naturalmente *L. (L.) amazonensis* em regiões endêmicas para leishmaniose cutânea cuja etiologia é atribuída a este parasito (DEANE et al., 1986; SAVANI et al., SHERLOCK, 1996). Mediante a estreita proximidade filogenética entre *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, é possível que esta última apresente o mesmo comportamento, considerando todas as evidências apresentadas neste trabalho.

A ocorrência de *L. (L.) amazonensis* tem sido registrada na Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai. No Brasil, o parasito é incriminado como agente etiológico de leishmaniose cutânea (LAINSON e SHAW, 1987, 2005). Destaca-se ainda casos de leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea difusa ou anérgica e leishmaniose dérmica pós-kala-azar (BARRAL et al., 1991).

Ambos os animais infectados naturalmente e experimentalmente neste trabalho não apresentaram sinais clínicos típicos da infecção por *L. (L.) amazonensis*, como lesões nodulares. Adicionalmente, o DNA do parasito foi identificado a partir de fragmentos de baço, sugerindo uma possível visceralização

do parasito. Casos caninos (HOFFMANN et al., 2013; TOLEZANO et al., 2007) e humanos (ALEIXO et al., 2006; BARRAL et al., 1991) de leishmaniose visceral atribuída à *L. (L.) amazonensis* tem sido descritos no Brasil.

Mediante ao viscetropismo de *L. (L.) amazonensis* observado na cidade de Jacobina, Estado da Bahia, SHERLOCK (1996) e WARBURG et al. (1994) levantaram a hipótese de que elementos da saliva de *Lu. longipalpis* poderiam modular o comportamento de *L. (L.) amazonensis* alterando seu tropismo para que o parasita cause a doença visceral, ao invés da cutânea.

O encontro em simpatria dos dois parasitas em Corumbá sendo transmitidos por *Lu. cruzi*, espécie altamente predominante, suscita a necessidade de investigação quanto à etiologia dos casos e coinfeção. Vale lembrar que, de acordo com dados da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, o coeficiente de letalidade registrado em Corumbá em 2014 foi de 75% (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

REFERÊNCIAS

ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M. O.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. B. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, 79-82, 2006.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO, A. J.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON JR, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BRITO, V. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C. O.; SOUSA, V. R. F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899–904, nov. 2014.

CASANOVA, C.; NATAL, D.; SANTOS, F. A. M. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an

endemic area of american cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 42-50, 2009.

DEANE, L. M.; RANGEL, E. F.; PAES-OLIVEIRA, M.; GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H.; SOUZA, N.; WERMELINGER, E.; BARBOSA, A. Experimental infection of *Lutzomyia longipalpis* fed on a patient with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania mexicana amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 133-134, 1986.

DORVAL, M. E .C; CUNHA, R. V. Epidemiological studies in a cutaneous leishmaniasis area in the municipality of Bela Vista, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.13, n.1, p.136, 2007.

EL TAI, N.O; OSMAR, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.H.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

HOFFMANN, A. R.; NAVARRO. I. T.; CAMARGO JR, V. E.; CALDART, E. T.; BREGANÓ, R. M.; PEREIRA, P. M. *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná State, Brazil – a case report. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, supp. 2, p. 3265-3270, 2012.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R. D. Ecology of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 82, p. 143-152, 1981.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A. J.; READY, P. D.; MOLYNEUX, D. H.; *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 196, p. 105-115, 1977.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, v. 266, p. 628-630, 1977.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology**. 10 ed. London: Hodder Arnold ASM Press, 2005. p. 313-49.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonian. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 385-395, 1968.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2015**. Campo Grande, 2015.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; WALLBANKS, K. R. The transmission of suprapylarian *Leishmania* by the bite of experimentally infected sand flies (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 425-430, 1987.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

SCHÖNIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SECUNDINO, N. F.; FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C.; DAVID, B. A.; PIMENTA, P. F. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasites & Vectors**, 5:20, 2012.

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; ROSA, A. C. O. C. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 125-126, 1986.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **TRENDS in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 91-92, 2007.

WARBURG, A.; SARAVIA, E.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 345, n. 1312, p. 223-230, 1994.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2010.

Tabela 1 – Transmissão experimental e natural de *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) amazonensis* para hamsters, via picada de flebotomíneos.

Animal	Tipo de transmissão (espécie de <i>Leishmania</i>)	Flebotomíneos expostos (alimentados)	Tempo para necropsia	Diagnóstico parasitológico		Diagnóstico molecular	Estado geral
				Direto	Cultura		
1	Experimental (<i>L. amazonensis</i>)	<i>Lu. cruzi</i> : 21 (6)	22 dias	Pos	...	Pos	Bom estado geral; sem sinais clínicos.
2	Natural (<i>L. infantum</i>)	<i>Lu. cruzi</i> : 87 (53)	6 meses	Neg	Neg	Pos	Emagrecimento acentuado, ascite e esplenomegalia (8,5 cm)
3	Natural (<i>L. infantum</i>)	<i>Lu. cruzi</i> : 5 (5)	4 meses	Pos	Pos	Pos	Caquexia e esplenomegalia (4,5 cm)
4	Natural (<i>L. amazonensis</i>)	<i>Lu. cruzi</i> : 299 (124) <i>Lu. forattinii</i> : 1 (0) <i>Ev. corumbaensis</i> : 3 (1)	6 meses	Neg	Neg	Pos	Bom estado geral; sem sinais clínicos.

... não realizado.

Figura 1 – Amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (A) e de *Leishmania (L.) infantum* (B) visualizadas a partir de imprint de baço dos animais infectados via picada de *Lu. cruzi*.

Nota: amplificação de 100x.

4.5 ARTIGO 5:

Distribuição mensal, fatores ambientais bióticos e abióticos relacionados à abundância de flebotomíneos em área urbana endêmica para leishmaniose visceral, Corumbá, Brasil

E. F. Oliveira, A. E. Casaril, W. S. Fernandes, M. S. Ravanelli, M. J. Medeiros, R. M. Gamarra, A. C. Paranhos Filho, E. T. Oshiro, A. G. Oliveira, E. A. B. Galati

RESUMO

A distribuição sazonal e a abundância de flebotomíneos podem sofrer interferência de fatores bióticos e abióticos. Consequentemente, efeitos sobre biodiversidade e o comportamento de insetos vetores de importância médica, bem como a transmissão de patógenos podem ser observados em decorrência de alterações ambientais em diferentes ecótopos. Este trabalho tem por objetivo avaliar a distribuição sazonal e verificar a associação entre a abundância de flebotomíneos e variáveis ambientais referentes à vegetação e clima. O estudo foi realizado durante dois anos, de abril de 2012 a março de 2014. A distribuição sazonal foi avaliada por meio da instalação semanal de armadilhas luminosas no peridomicílio de cinco residências na área urbana do Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Variáveis meteorológicas obtidas junto ao Centro de Monitoramento do Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul, índices radiométricos calculado a partir de imagens de alta resolução espacial (GeoEye) e o percentual de cobertura vegetal foram utilizados neste estudo. Diferenças entre a abundância de flebotomíneos e os locais de coleta foram verificadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A presença de correlação entre as variáveis ambientais foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. *Lutzomyia cruzi*, *Lu. forattinii* e *Evandromyia corumbaensis* foram as espécies mais frequentes durante os dois anos de coleta. Embora não tenha sido observada a presença de associação entre essas espécies e as variáveis ambientais de vegetação e clima, foi possível observar picos elevados populacionais na estação chuvosa e picos menores na estação seca. O padrão da distribuição sazonal das espécies de flebotomíneos demonstrado neste estudo foi determinado basicamente pelos espécimes de *Lu. cruzi* capturados, uma vez que eles representam 93,94%. A

variação mensal demonstrou que a espécie *Lu. cruzi* tem grande plasticidade, tendo sido observada em todos os meses de coleta.

INTRODUÇÃO

A distribuição sazonal e a abundância de flebotomíneos podem sofrer interferência de fatores bióticos e abióticos. Variáveis como temperatura, umidade e precipitação pluviométrica, podem influenciar diretamente uma população de flebotomíneos, dependendo da região, do tempo e das espécies analisadas (FORATTINI, 1973; DEANE, 1956; OLIVEIRA et al., 2012, 2013a).

A dinâmica e a intensidade da transmissão de agentes infecciosos apresentam heterogeneidade espacial e temporal significativa. Entretanto, há poucas informações disponíveis sobre a distribuição geográfica de casos humanos, reservatórios e vetores (BROOKER e UTZINGER, 2007; HAY e SNOW, 2006).

Diferentes estudos sobre os efeitos do clima e de alterações antrópicas de ecossistemas sobre a biodiversidade e abundância de vetores e, conseqüentemente, a transmissão de patógenos (BONDS et al., 2009; YANG e FERREIRA, 2000) têm utilizado modelos matemáticos e estatísticos para identificar o máximo de fatores envolvidos na ocorrência de doenças infecciosas vetoriais (PARHAM et al., 2015).

O emprego associado de ferramentas geoespaciais, sistemas de informação geográfica e da geoestatística, tem permitido o estudo as inter-relações entre saúde, meio ambiente e condições socioeconômicas, bem como da distribuição temporal e espacial de diversas doenças. Esses estudos têm fornecido informações importantes para a vigilância em saúde, como o monitoramento e mapeamento de fatores riscos de impacto em saúde pública, além de permitirem a melhor descrição, compreensão e previsão da distribuição geográfica (HAY e SNOW, 2006; PETERSON et al., 2002; WERNECK et al., 2007). Por último, destaca-se o potencial para melhorar a segmentação espaço-temporal das medidas de controle e a relação custo-eficácia dos programas de manejo integrado de doença (BROOKER e UTZINGER, 2007).

Diversos índices radiométricos, definidos como medidas radiométricas capazes de identificar em imagens digitais ou de resolução espacial a abundância relativa e a atividade de determinados tipos de informações, tais como áreas urbanizadas, cobertura vegetal, corpos hídricos, área foliar (CÂMARA e MONTEIRO,

2001; NOVO, 2008), têm sido utilizados em estudos entomológicos (ANDRADE et al., 2014; CASARIL et al., 2014; CROSS et al., 1996; ELNAIEM et al., 1998; ÖZBEL et al., 2011). O uso de dados derivados de imagens de satélites, como o índice de vegetação pela diferença normalizada (NDVI), tem permitido a identificação e monitoramento da diversidade de vegetação, bem como a delimitação do espaço geográfico e de áreas de risco para algumas doenças endêmicas, como a leishmaniose visceral (WERNECK e MAGUIRE, 2002).

Considerando o exposto, este trabalho tem por objetivo avaliar a distribuição mensal e verificar a associação entre a abundância de flebotomíneos e variáveis ambientais referentes à vegetação e clima.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local e período da pesquisa

Este estudo foi realizado de abril de 2012 a março de 2014 no perímetro urbano do Município de Corumbá (19° 00' 33" S; 57° 39' 12" O; 118 m. a. n. m), que está localizado na porção noroeste do Estado de Mato Grosso do Sul, região do Pantanal Sul-mato-grossense, fazendo fronteira com a Bolívia (Figura 1). O município possui área total estimada de 64.962,8 km², o que representa 18,19% da extensão territorial do Estado. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2014, a população total estimada era de 108.010 habitantes, com densidade demográfica de 1.60 (hab/km²), sendo que 90% residem no perímetro urbano da cidade (IBGE, 2014).

A cobertura vegetal predominante do município é o Cerrado típico do Pantanal. A flora descrita é composta por 937 espécies de plantas superiores e samambaias, sendo 228 espécies de árvores, 204 de arbustos, 331 de ervas e 167 de trepadeiras ou lianas (POTT et al., 2000).

De acordo com o sistema de classificação de Köppen, o clima de Corumbá é do tipo tropical (Aw), megatérmico, com inverno seco e verão chuvoso (ALVARES et al., 2013). Essa região pantaneira apresenta duas principais estações climáticas de acordo com o regime de chuvas: seca (de abril a setembro) e chuvosa (de outubro a março) (SORIANO, 1997).

Coleta de flebotomíneos

A distribuição mensal de flebotomíneos foi avaliada por meio da instalação semanal de armadilhas luminosas automáticas tipo CDC, de abril de 2012 a março de 2014. Cinco residências foram selecionadas por conveniência, com auxílio do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Corumbá, em bairros com notificação de casos humanos de LV no ano anterior ao início das coletas (Figura 1). Breve descrição sobre as características de cada peridomicílio é apresentada no quadro 1. Em cada residência, foram instaladas duas armadilhas na área peridomiciliar das 17:00 h às 7:00 h.

Após o recolhimento das armadilhas, os espécimes foram eutanasiados com éter, triados para a remoção de outros insetos e mantidos a -20 °C até o transporte ao Laboratório de Parasitologia da UFMS para a identificação específica de acordo com GALATI (2003). Todos os machos foram clarificados e montados em lâmina para a identificação. Até o sexto mês de coleta (setembro/2012), as fêmeas também foram clarificadas e montadas. Após este período, as fêmeas capturadas sem resquícios de sangue no intestino, depois de identificadas pela morfologia da espermateca, foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL com álcool isopropílico para investigação de infecção natural por *Leishmania*, que está apresentado em outro estudo.

Índices de cobertura vegetal e área de superfície impermeável

Como base cartográfica para as análises ambientais de vegetação e área de superfície impermeável, foram utilizadas imagens GeoEye de 20 de agosto março de 2012, que são compatíveis com o ambiente urbano. As imagens adquiridas já estavam ortorectificadas e geometricamente corrigidas, com projeção e *datum* definidos. A projeção utilizada foi a *Universal Transverse Mercator* (UTM), hemisfério Sul, zona 21 e o *datum* WGS84.

Com o auxílio do software PCI Geomatica versão 9.1 (PCI GEOMATICS, 2003) foi realizada a combinação de bandas para a geração da imagem multiespectral. A partir desta, foi realizada a correção atmosférica para então calcular o índices de vegetação e umidade por diferença normalizada, NDVI e

NDWI, respectivamente, e a área de superfície impermeável (ISA) em torno dos pontos de coleta de flebotômicos, com buffers de 100 e 200 metros.

Os valores de NDVI são normalizados para o intervalo de -1 a +1 (PONZONI; SHIMABUKURO, 2007), sendo calculado pela seguinte relação:

$$NDVI = \frac{(NIR - R)}{(NIR + R)}$$

onde:

- *NIR* = reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo; e
- *R* = reflectância da vegetação na banda do vermelho.

As informações dos valores de NDVI para cada local de coleta foram estratificadas para a obtenção de variáveis referentes aos atributos de paisagem de diferentes escalas, como a complexidade do habitat (média de NDVI) e a heterogeneidade do habitat (desvio padrão do NDVI – DP NDVI) (CORRÊA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). A complexidade do habitat pode ser entendida como a densidade e o desenvolvimento do estrato vertical da vegetação em determinada unidade de área e a heterogeneidade do habitat como a estrutura no plano horizontal da vegetação (DAJOZ, 2005).

O NDWI também possui valores normalizados para o intervalo de -1 a +1 e foi calculado de acordo com o proposto por McFEETERS (1996):

$$NDWI = \frac{(GREEN - NIR)}{(GREEN + NIR)}$$

onde:

- *NIR* = reflectância da vegetação na banda do infravermelho próximo; e
- *GREEN* = reflectância da vegetação na banda do verde.

A área de superfície impermeável (ISA), também entendida como o grau de impermeabilização do solo foi calculado de acordo com CARLSON e ARTHUR (2000), que utiliza o cálculo do NDVI na equação:

$$ISA = \left[1 - \left(\frac{(NDVI - NDVI_0)}{(NDVI_s + NDVI_0)} \right)^2 \right]_{dev}$$

onde:

- *NDVI₀* = representa os valores de NDVI para solo exposto; e

- $NDVI_S$ = representa os valores de NDVI para vegetação densa.

O termo *dev* indica que a fórmula é apropriada somente para regiões classificadas como urbanas. Neste caso, quanto mais próximo do número um, mais impermeável será uma superfície avaliada.

Os percentuais de cobertura vegetal foram estimados com auxílio de um densiômetro esférico. Este aparelho trata-se de um espelho convexo quadriculado com 36 vértices no qual são contados os vértices que refletem a cobertura da vegetação lenhosa sob quatro perspectivas diferentes (norte, sul, leste e oeste), sendo cada observação com uma rotação de 90° em relação à anterior para cada ponto. Foi calculada a média aritmética dos valores das quatro observações para então obter o percentual de cobertura vegetal com uma regra de três simples. Em cada local de coleta foram realizadas cinco medições em distribuições aleatórias no entorno no ponto.

Variáveis meteorológicas

Os dados climáticos referentes ao período de estudo foram extraídos do banco de dados Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul (Cemtec) que é vinculado ao Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet). Foram obtidos valores de aferições diárias das variáveis meteorológica utilizadas neste estudo (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e velocidade do vento). Para a temperatura e umidade relativa do ar, foram consideradas as médias diárias nas datas de coleta e as médias de sete, 15 e 30 dias anteriores à data de cada coleta. Tratamento semelhante foi dado a variável precipitação pluviométrica, no entanto, ao invés de valores médios, foi utilizado o valor acumulado (somatório).

Análise estatística

O total de espécimes coletados e as três espécies mais abundantes foram avaliados pela média mensal geométrica de Williams (HADDOW, 1954, 1960) e também pela média mensal aritmética, uma vez que ambas são medidas de tendência central e refletem a frequência das espécies por coletas, bem como a

regularidade nas mesmas. As demais medidas descritas (desvio padrão, mediana, valores máximo e mínimo) também foram calculadas.

A proporção do total de espécimes e das três espécies mais abundantes, considerado a divisão por sexo, entre os locais de coleta foi comparada com o teste de Kruskal-Wallis e o p -valor foi utilizado para testar a hipótese de igualdade.

As comparações das frequências absolutas do total de flebotomíneos e das três espécies mais abundantes entre os sexos e as estações climáticas (seca e chuvosa) foram feitas utilizando-se o teste de Wilcoxon.

O grau de associação entre as variáveis meteorológicas e o número de exemplares de flebotomíneos foi avaliado pelo coeficiente de correlação de Spearman. A mesma análise foi empregada para as correlações entre número de espécimes e as variáveis ambientais avaliadas (vegetação e área impermeável).

Em todos os casos, o valor de p usado para demonstrar a significância estatística foi de 0,05. As análises foram conduzidas no software R versão 3.1.2 (R CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS

De abril de 2012 a março de 2014, foram realizadas 750 coletas semanais, nas quais foram coletados 14.317 espécimes de flebotomíneos, sendo 7.370 (em 390 coletas) no primeiro ano e 6.947 no segundo (em 360 coletas). Os exemplares estão distribuídos em oito gêneros (*Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Martinsmyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia* e *Sciopemyia*) e 13 espécies: *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Evandromyia cortelezii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia aldafalcaoae* (Santos, Andrade-Filho e Honer, 2001), *Evandromyia corumbaensis* (Galati, Nunes, Oshiro & Rego, 1989), *Evandromyia sallesi* (Galvão e Coutinho, 1940), *Evandromyia walkeri* (Newstead, 1914), *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938), *Lutzomyia forattinii* (Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985), *Micropygomyia peresi* (Mangabeira, 1942), *Martinsmyia oliveirai* (Martins, Silva & Falcão, 1970), *Nyssomyia whtimani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Psathyromyia bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), conforme apresentado na tabela 1. Destaca-se a primeira descrição de *Ny. whtimani* nesta região.

As medidas descritivas para o total de flebotomíneos coletados e para as três espécies mais abundantes foram analisadas segundo o local de coleta e estão apresentadas na tabela 2. Em todos os casos (análise total e por espécie), pelo teste de Kruskal-Wallis, a média mensal aritmética não está distribuída de modo uniforme entre os locais de coleta, ou seja, um ou mais locais de coleta distinguem-se dos demais na abundância de flebotomíneos. Descritivamente, a média geométrica de Williams apresentou o mesmo comportamento. Devido estas diferenças, o número total foi analisado de maneira condicional.

Lu. cruzi foi a espécie mais frequente com 93,94% do total ($n = 13.449$), seguida por *Lu. forattinii* 3,22% ($n = 461$) e *Ev. corumbaensis* 1,76% (252). Esta ordem de abundância se manteve na análise por local de coleta.

Proporcionalmente, os machos foram significativamente mais abundantes que as fêmeas ($W = 65.797$; $p < 0,001$). Analisando separadamente as três espécies mais frequentes, esta proporcionalidade também se manteve: *Lu. cruzi* ($W = 66.444,50$; $p < 0,001$); *Lu. forattinii* ($W = 48.327,50$; $p = 0,006$); e *Ev. corumbaensis* ($W = 38.346,50$; $p < 0,001$).

A figura 2 apresenta a distribuição mensal de *Lu. cruzi*, *Lu. forattinii* e *Ev. corumbaensis*. A distribuição mensal de *Lu. cruzi* e das médias mensais das variáveis climáticas (exceto precipitação pluviométrica, que foi considerado o acumulado mensal) estão plotadas na figura 3. Durante o período de estudo, a temperatura média anual foi de 26,24°C, a umidade relativa do ar média anual de 67,43%, a precipitação pluviométrica acumulada de 2.312,80 mm³ e a velocidade do vento média anual de 15,19 km/h. Dados referentes temperatura e umidade estão apresentados na tabela 3. Não foram observadas associações significativas entre as frequências absolutas, total e por espécie, de flebotomíneos e as variáveis meteorológicas considerando todas as derivações abordadas (média diária do dia de coleta e as médias de sete, 15 e 30 dias anteriores à data de cada coleta). Na análise da distribuição de abundância por estação climática, somente para fêmeas de *Ev. corumbaensis* não foi possível aceitar a hipótese de igualdade entre as estações ($W = 503,50$; $p = 0,05$). Entretanto, foi possível identificar quatro picos populacionais acentuados na estação chuvosa e dois picos menores na estação seca para *Lu. cruzi*. De maneira semelhante, dois picos populacionais de *Lu. forattinii* e *Ev. corumbaensis* foram observados em meses da estação chuvosa.

A tabela 4 apresenta os índices de vegetação e a área de superfície impermeável, obtidos por meio de sensoriamento remoto, e o percentual de cobertura vegetal calculado a partir do densímetro esférico. Não foram observadas associações significativas entre as frequências absolutas de flebotomíneos e estas variáveis, incluindo os atributos de paisagem complexidade e heterogeneidade do habitat.

DISCUSSÃO

Embora o primeiro caso humano de leishmaniose visceral tenha sido registrado em 1911 (DEANE, 1956; MIGONE, 1913) no Distrito de Porto Esperança, em Corumbá, a fauna flebotomínea desta cidade passou a ser estudada somente a partir da década de 80 (GALATI et al., 1985, 1997), sendo, a priori, composta por 12 espécies com destaque para *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, que são as mais abundantes na região urbana da cidade (CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1985, 1997; SANTOS et al., 1998).

Em 2001, SANTOS et al. (2003) relataram a presença de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), em Corumbá. Todavia, os demais estudos apontam a ausência desta espécie e o predomínio de *Lu. cruzi* (ALMEIDA et al., 2010; CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998), que teve sua competência vetorial para *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) amazonensis* demonstrada recentemente (OLIVEIRA et al., artigo 4 desta tese). Ainda merece atenção o fato de que *Lu. forattinii*, espécie antropofílica, encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* (PITA-PERREIA et al., 2008) também possa atuar na transmissão do parasito nas áreas rurais e urbanas da cidade (GALATI et al., 1997). A presença de *Ny. whitmani*, espécie associada à transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916 em algumas regiões do Brasil (LAINSON; SHAW, 2005), é relatada pela primeira vez em Corumbá e destaca a necessidade de monitoramentos periódicos da fauna e a pesquisa por reservatórios do parasito, a fim de identificar possíveis picos populacionais e a presença e circulação de *L. (V.) braziliensis* na área de estudo.

O aparecimento de novas espécies na composição da fauna de flebotomíneos na área urbana de Corumbá, acompanhando do aumento da abundância de *Lu. cruzi*, pode ter ocorrido, entre outros fatores, devido ao processo de urbanização

observado na cidade (CASARIL et al., 2014). De acordo com RANGEL e VILELA (2008), as alterações ambientais antrópicas podem alterar a distribuição vetores e parasitos, e, conseqüentemente, a epidemiologia das leishmanioses. CASARIL et al. (2014) sugerem que atividades como desmatamento e extrativismo, a presença de assentamentos rurais e a ocupação desordenada da população em direção às áreas de morrarias recobertas por vegetação nativa poderiam explicar a alteração da fauna flebotomínea e a manutenção da leishmaniose visceral no município.

Durante os dois anos de estudos foram coletados 14.317 espécimes de flebotomíneos, com destaque para *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* que foram as espécies mais frequentes. Analisando descritivamente a frequência absoluta de espécimes, os três ecótopos com maior número de flebotomíneos capturados possuem galinheiro no peridomício. A elevada atratividade de galinhas para os flebotomíneos é descrita com frequência na literatura (ALEXANDER et al., 2002; JERALDO et al., 2012; LAINSON; RANGEL, 2005; TEODORO et al., 2007), uma vez que abrigos de animais com presença de solo e matéria orgânica, como galinheiros e pocilgas, são reconhecidos como locais de abrigo, repasto sanguíneo para fêmeas e criadouros para as formas imaturas (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999; FORATTINI, 1973; OLIVEIRA et al., 2013b). TEODORO et al. (2007) avaliaram a atratividade de galinhas aos flebotomíneos e capturaram o dobro de exemplares em ambientes com estas aves, ao trabalharem com oito espécies desse díptero. Segundo XIMENES et al. (1999), a presença de animais domésticos, associado às precárias condições de limpeza local, contribui para a manutenção da alta densidade populacional destes dípteros.

Em relação à distribuição mensal, *Lu. cruzi* e *Ev. corumbaensis* foram capturados em todos os meses de coleta. *Lu. forattinii* apenas não foi coletado em fevereiro de 2013. Os picos populacionais observados em ambas as estações, chuvosa e seca, denotam o caráter adaptativo de *Lu. cruzi* às variações climáticas e também ao ambiente urbano. De maneira semelhante, dois picos populacionais de *Lu. forattinii* e *Ev. corumbaensis* também indicam esse comportamento adaptativo. Em Corumbá, a temperatura média tanto mensal, como nas derivações avaliadas, manteve-se acima de 25 °C em praticamente todos os meses do ano. A precipitação pluviométrica não apresentou frequência regular e as estações chuvosa e seca foram bem definidas. Contudo, a umidade relativa do ar, embora tenha apresentado desvio padrão variando de 14,08 a 11,56, oscilou com baixa intensidade,

provavelmente devido à adjacência da cidade ao Rio Paraguai. Ressalta ainda a alteração no regime hidrológico deste rio em 2014: o período de cheia que normalmente ocorre de janeiro a março, foi registrado de janeiro a junho.

Ev. corumbaensis foi a única espécie associada significativamente à estação úmida. Esta espécie não demonstrou estar relacionada a variáveis meteorológicas em outras regiões do Brasil (SOUZA et al., 2004; RÊBELO, 2001).

Essa tendência de altas abundâncias na estação chuvosa tem sido relatada em algumas partes do Brasil, como as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste para *Lutzomyia longipalpis* (DEANE, 1956; GALATI et al., 1997, 2003, 2006; JERALDO et al., 2012; MARGONARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013a, 2006; RÊBELO, 2001; RESENDE et al., 2006) e para *Lu. cruzi* em Corumbá (GALATI et al., 1997) e em Jaciara, MT (BRITO et al., 2014). Todavia, alguns autores demonstraram que esses insetos também podem ser encontrados em meses mais secos (GALATI et al. 1996; ZELEDÓN et al., 1984).

A maioria dos estudos de distribuição sazonal de insetos avalia a relação, seja descritivamente ou estatisticamente, entre a abundância de flebotomíneos e variáveis meteorológicas considerando apenas valores médios mensais (temperatura e umidade) ou acumulado mensais (precipitação pluviométrica). Contudo, essas abordagens nem sempre refletem as reais condições meteorológicas que, de fato, possam estar associadas e/ou influenciarem a abundância e o comportamento de diferentes artrópodes. Por isso, neste trabalho foi adotada uma abordagem diferente, que considera as aferições climáticas no dia de cada coleta, como uma alternativa de verificar condições que pudessem afetar a frequência e comportamento dos adultos durante a coleta, como o a velocidade do vento, conforme relatado por outros autores (GARMS et al., 1979; KAKITANI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013a). Paralelamente, avaliaram-se ainda as médias de sete, 15 e 30 dias anteriores à data de cada coleta a fim de avaliar fatores que também influenciassem as fases imaturas de flebotomíneos, além dos adultos, ao considerar que (1) as variáveis climáticas dos micro-habitats representados pelos criadouros sofram influência, mesmo que em menor escala, do ambiente externo e de suas condições ambientais e (2) o tempo médio de desenvolvimento imaturo de *Lu. cruzi* que varia de 26 a 30 dias (OLIVEIRA et al., artigo 1 submetido à publicação). Embora não tenham sido observadas associações estatísticas nesta

abordagem, ficou evidente que há a tendência de *Lu. cruzi*, *Lu. forattinii* e *Ev. corumbaensis* serem mais abundantes na estação úmida.

Estudos de diversidade e distribuição de espécies de flebotomíneos constituem elementos chaves para a elucidação da ecologia e epidemiologia das leishmanioses (ASHFORD, 2000; GALATI et al., 1997; LAINSON e RANGEL, 2005; LAINSON e SHAW, 2005). Pesquisas de campo, associadas com geotecnologias e diferentes metodologias de análise espacial, permitem o monitoramento da população desses insetos, a identificação de focos de maior abundância de espécies vetorais ou potencialmente vetorais e a distribuição espacial de reservatórios e hospedeiros, que podem estar relacionados com a presença, quantidade e o tipo de vegetação numa determinada área e período de tempo (APARICIO e BITENCOURT, 2004; BECK et al., 2000). O uso de geotecnologias tem permitido identificar características ambientais presentes em áreas antropizadas, endêmicas para LV e com grande número de flebotomíneos, e, assim, sugerir que em outras áreas com características ambientais similares possa haver o risco de infecção humana e de animais domésticos por *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2012).

No Estado de Mato Grosso, *Lu. cruzi* foi observado com elevada abundância em municípios cujos biomas Pantanal e Cerrado estão presentes, sugerindo serem esses os ambientes preferenciais da espécie (MISSAWA e LIMA, 2006). Fato semelhante ocorre em Corumbá, onde a vegetação predominante é o Cerrado típico do Pantanal (CASARIL et al., 2014; GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998).

Neste estudo, o sensoriamento remoto foi utilizado para a avaliação da cobertura vegetal e da área impermeabilizada por meio de índices radiométricos. Paralelamente, percentual de cobertura vegetal ou de fitomassa foi mensurado diretamente em campo com auxílio do densiômetro esférico. A partir dos valores encontrados para ambas as metodologias não foram observadas associações significativas entre a abundância total e por espécie de flebotomíneos e os índices quantitativos de fitomassa, de umidade e de área superficial impermeável. Consequentemente, os atributos de paisagem (complexidade e heterogeneidade do habitat) obtidos a partir do NDVI também demonstraram não afetar a abundância e distribuição de *Lu. cruzi*, ao contrário do observado para *Lu. longipalpis* na cidade de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA et al., 2012). No entanto, deve ser considerada a unidade amostral composta por apenas cinco pontos de

coletas que podem não ser representativos da área de estudo, e, consequentemente, não refletem a relação entre estas variáveis.

Mesmo na ausência de correlação, o uso de índices radiométricos e de percentuais de cobertura vegetal é de grande importância em entomologia, uma vez que ao analisar a vegetação, fatores que influenciam o comportamento de flebotomíneos como temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e elevação, são indiretamente avaliados (APARICIO, 2001). ANDRADE et al. (2014) ainda ressaltam a importância da avaliação da umidade na vegetação estudada por meio do NDWI, que está relacionada com o teor de água na vegetação e umidade do solo, sendo diretamente relacionado ao desenvolvimento imaturo do inseto, uma vez que os estádios larvais de flebotomíneos requerem um ambiente úmido.

Estudos como este e outros que se propõem a avaliar o relacionamento entre abundância de insetos de importância médica e variáveis ambientais, incluindo as meteorológicas, devem considerar (além das características locais/individuais dos ecótopos estudados) a interação existente entre tais variáveis. Desconsiderar este fato pode conduzir a conclusões inadequadas ou parciais durante a interpretação e mensuração do relacionamento alvo do estudo. Em um estudo recente de revisão sobre o impacto das mudanças ambientais, climáticas e sócias sobre as doenças infecciosas vetoriais, PARHAM et al. (2015) destacam os níveis de complexidade na descrição e previsão dos impactos das variações e alterações climáticas sobre a transmissão de agentes infecciosos por vetores. Os autores enfatizam que, embora os padrões climáticos tenham efeitos diretos sobre a abundância de vetores e a transmissão de agentes infecciosos, essa influência pode ser significativamente alterada por fatores de confusão não climáticos (epidemiológicos, ambientais, sociais, econômicos e demográficos) que podem camuflar a real magnitude e extensão espacial da transmissão em diferentes escalas.

O padrão da distribuição sazonal das espécies de flebotomíneos demonstrado neste estudo foi determinado basicamente pelos espécimes de *Lu. cruzi* capturados, uma vez que eles representam 93,94% do total. A variação mensal demonstrou que a espécie *Lu. cruzi* tem grande plasticidade, tendo sido observada em todos os meses de coleta no Município de Corumbá, tanto em períodos secos como em períodos úmidos. Esse fato demonstra que há possibilidade de risco de infecção durante todos os meses do ano com períodos nos quais este risco pode ser maior,

alertando para o planejamento e a tomada de decisões para o controle da doença e a adoção de práticas de educação em saúde ambiental junto à população.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 3, p. 207-255.

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.

ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, A. D.; MINZÃO, L. D.; PORTES, F.; MIRANDA, A. M.; FACCENDA, O.; ANDRADE FILHO, J. D. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 304-310, 2010.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, p. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANDRADE, A. R. O.; SILVA, B. A. K.; CRISTALDO, G.; ANDRADE, S. M. O.; PARANHOS FILHO, A. C.; RIBEIRO, A.; SANTOS, M. F. C.; ANDREOTTI, R. Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 260, 2014.

APARICIO, C. **Utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto orbital para análise espacial de paisagem com incidência de leishmaniose tegumentar americana**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 2001.

APARICIO, C.; BITENCOURT, M. D. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 511-516, 2004.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, 1269-1281, 2000.

BARCELLOS, C.; BASTOS, F. I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, n. 3, p. 389-397, 1996.

BECK, L. R.; LOBITZ, B. M.; WOOD, B. L. Remote sensing and human health new sensors and new opportunities. *Emerging Infectious Disease*, v. 6, n. 3, p. 217-227, 2000. BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BONDS, M. H.; KEENAN, D. C.; ROHANI, P.; SACHS, J. D. Poverty trap formed by the ecology of infectious diseases. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 277, p. 1185-1192, 2009.

BRITO, V. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C. O.; SOUSA, V. R. F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

BROOKER, S.; UTZINGER, J. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. **Geospatial Health**, v. 2, p. 141-146, 2007.

CÂMARA, G.; MONTEIRO, A. M. V. Conceitos básicos em ciência da geoinformação. In: CÂMARA, G.; DAVIS, C. MONTEIRO, A. M. V. (Ed.). **Introdução à ciência da geoinformação**. São José dos Campos: INPE, cap. 2, p. 12-41, 2001.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; READY, P. D.; DAVIES, C. R. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 2, p. 209-211, 1999.

CARLSON, T. N.; ARTHUR, S. T. The impact of land use – land cover changes due to urbanization on surface microclimate and hydrology: a satellite perspective. **Global and Planetary Change**, v. 25, n. 1-2, p. 49-65, 2000.

CASARIL, A. E.; MONACO, N. Z. N.; OLIVEIRA, E. F.; EGUCHI, G. U.; PARANHOS FILHO, A. C.; PEREIRA, L. E.; OSHIRO, E. T.; GALATI, E. A. B.; MATEUS, N. L. F.; OLIVEIRA, A. G. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 364, 2014.

CORRÊA, C. C.; PIMENTA, M.; DUTRA, S. L.; MARCO JÚNIOR, P. Utilização do NDVI na avaliação da resposta de besouros herbívoros à complexidade e heterogeneidade ambiental em diferentes escalas no Bioma Cerrado. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2011, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: INPE, 2011, p. 3103.

CROSS, E. R.; NEWCOMB, W. W.; TUCKER, C. J. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 5, p. 530-536, 1996.

DAJOZ, R. **Princípios de ecologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.

ELNAIEM, D. E. A.; CONNOR, S. J.; THOMSON, M. C.; HASSAN, M. M.; HASSAN, H. K.; ABOUD, M. A.; ASHFORD, R. W. Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Germantown, v. 92, n. 8, p. 877-887, Dec.1998.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: psychodidae, phlebotominae, leishmanioses, bartonelose**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1973.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-51.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; ROCHA, C. R.; GARCIA, W. B. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, p. 115-28, 1996.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; DAMASCENO-JÚNIOR, G. A. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 175-193, 2006.

GALATI, E. A. B.; REGO JÚNIOR, F. A.; NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T. Fauna flebotomínica do município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyia forattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, n.2, p. 261-266, 1985.

GARMS, R.; WALSH, J. F.; DAVIES, J. B. Studies on the reinvasion of the onchocerciasis control programme in the Volta River Basin by *Simulium damnosum* s.l. with emphasis on the south-western areas. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 30, n. 3, p. 345-362, 1979.

HADDOW, A. J. Studies on the biting habits of African mosquitoes: An appraisal of methods employed with special reference to the twenty-fourhours catch. **Bulletin of Entomological Research**, v. 45, n. 1, p.199-242, 1954.

HADDOW, A. J. Studies on the biting habits and medical importance of East African mosquitoes in the genus *Aedes*. I subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 50, n. 4, p. 759-779, 1960.

HAY S. I.; SNOW, R. W. The malaria atlas project: developing global maps of malaria risk. **PLoS Medicine**, v. 3, p. e473, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa da População 2014: Mato Grosso do Sul, Corumbá**. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2014. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/36WA1>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2015.

JERALDO, V. L. S.; GÓES, M. A. O.; CASANOVA, C.; MELO, C. M.; ARAÚJO, E. D.; BRANDÃO FILHO, S. P.; CRUZ, D. E. R.; PINTO, M. C. Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 3, p. 318-322, 2012.

KAKITANI, I.; UENO, H. M.; FORATTINI, O. P. Paridade e influência do vento sobre a frequência de *Anopheles marajoara*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 280-284, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Eds.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology**. 10 ed. London: Hodder Arnold ASM Press, 2005. p. 313-49.

MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C. M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A. H.; PESSANHA, J. E.; DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 31-38, 2006.

McFEETERS, S. K. The use of the Normalized Difference Water Index (NDWI) in the delineation of open water features. **International Journal of Remote Sensing**, v. 17, n. 7, p.1425-1432, 1996.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

NOVO, E. M. L. M. **Sensoriamento remoto: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R. O.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 396-401, 2012.

OLIVEIRA, E. F.; FERNANDES, C. E. S.; SILVA, E. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Climatic factors and population density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in an urban endemic area of visceral leishmaniasis in Midwest Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, n. 2, p. 224-228, 2013a.

OLIVEIRA, E. F. SILVA, E. A.; CASARIL, A. E.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G.

Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 277-284, 2013b.

ÖZBEL Y, BALCIOĞLU C, ÖLGEN MK, ŞİMSEK FM, TÖZ SÖ, ERTABAKLAR H, DEMİR S, ALKAN MZ. Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, p. S99-S105, 2011.

PARHAM, P. E.; WALDOCK, J.; CHRISTOPHIDES, G. K.; HEMMING, D.; AGUSTO, F.; EVANS, K. J.; FEFFERMAN, N.; GAFF, H.; GUMEL, A.; LADEAU, S.; LENHART, S.; MICKENS, R. E.; NAUMOVA, E. N.; OSTFELD, R. S.; READY, P. D.; THOMAS, M. B.; VELASCO-HERNANDEZ, J.; MICHAEL, E. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 370, n. 1665, pii. 20130551, 2015.

PCI GEOMATICS. **PCI Geomatica. Versão 9.1 for Windows**. Ontário, Canadá, 2003.

PETERSON, A. T.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; BEARD, C. B.; RAMSEY, J. M. Ecologic niche modeling and potential reservoirs for Chagas disease, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 662-667, 2002.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. **Sensoriamento remoto no estudo da vegetação**. São José dos Campos: Parêntese, 2007.

POTT, A.; SILVA, J. S. V.; SALIS, S. M.; POTT, V. J. SILVA, M. P. Vegetação e uso da terra. In: SILVA, J. S. V. **Zoneamento ambiental**. Borda Oeste do Pantanal. Maciço do Urucum e Adjacências, cap. 8, p. 111-132, 2000.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (DIPTERA, PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) AND URBANIZATION OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZIL. **CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA**, V. 24, N. 12, P. 2948-2952, 2008.

REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 1, p. 221-227, 2001.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; HOFFMANN, M. P.; FURLAN, M. B. G.; FERREIRA, W. F.; PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American Visceral Leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*.

Corumbá, Mato Grosso do Sul state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. INCRIMINATION OF *LUTZOMYIA CRUZI* AS A VECTOR OF AMERICAN VISCERAL LEISHMANIASIS. **MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY**, V. 12, N. 3, P. 315-317, 1998.

SORIANO, B. M. A. **Caracterização climática de Corumbá, MS**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1997. 25p.

SOUZA, C. M.; PESSANHA, J. E.; BARATA, R. A.; MONTEIRO, E. M.; COSTA, D. C.; DIAS, E. S. Study on Phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 795-803, 2004.

TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; DIAS, A. C. ABBAS, M.; ALBERTON, D.; SANTOS, D. R. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 383-388, 2007.

WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N.; WALKER, A. M.; DAVID, J. R.; WAND, M.; MAGUIRE, J. H. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p.195-201, 2007.

WERNECK, G. L.; MAGUIRE, J. H. Spatial modeling using mixed models an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 633-637, 2002.

XIMENES, M. F. F. M.; CASTELLON, E. G.; SOUZA, M. F.; MENEZES, A. A. L.; QUEIROZ, J. W.; SILVA, V. P. M.; JERÔNIMO, S. M. B. Effect of abiotic factors of seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006.

YANG, H. M.; FERREIRA, M. U. Assessing the effects of global warming and local social and economic conditions on the malaria transmission. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 214-222, 2000.

ZELEDÓN, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 455-459, 1984.

Figura 1 – Distribuição espacial dos pontos de coleta semanais para a avaliação da distribuição mensal de flebotomíneos, Corumbá, MS, abril/2012 a março/2014.

Número de 1 a 5 indicam os locais (bairros) de coletas de flebotomíneos. 1 = Centro; 2 = Maria Leite; 3 = Cristo Redentor; 4 = Popular Nova; 5 = Nova Corumbá. A área urbana de Corumbá está representada em uma imagem GeoEye (20/08/2012) na composição falsa-cor.

Figura 2 – Distribuição mensal de *Lu. cruzi*, *Lu. forattinii* e *Ev corumbaensis*, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Figura 2 – Distribuição mensal de *Lu. cruzi* e das variáveis meteorológicas avaliadas, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Lu.cruziT: soma de machos e fêmeas de *Lutzomyia cruzi*.

Quadro 1 – Características gerais dos locais de coleta, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Residência (Bairro)	Características gerais	Animais domésticos (quantidade)
Centro	Localizado na região central da cidade. Possui amplo peridomicílio, com presença de árvores de grande e médio porte, sendo algumas frutíferas. Este local de coleta mais próximo do leito do Rio Paraguai, distando dele aproximadamente 500 metros.	Cães (2) Galinha (1)
Cristo Redentor	Localizado na região periférica (sudeste) da cidade. O peridomicílio limita-se com a borda da morraria coberta com vegetação nativa presente na região e possui apenas algumas árvores de pequeno porte.	Cão (1)
Maria Leite	Localizado na região periférica (nordeste) da cidade. Apresenta o maior peridomicílio em comparação aos demais. Possui árvores de grande e médio porte sendo algumas frutíferas.	Cães (2) Galinhas (15*) Gansos (5) Patos (3)
Nova Corumbá	Localizado na região periférica (porção sul) da cidade. O peridomicílio limita-se com a borda da morraria e da vegetação nativa do Cerrado presente na região e possui árvores de médio e pequeno porte, sendo algumas frutíferas.	Cães (5) Galinhas (4) Gatos (03)
Popular Nova	Localizado na região periférica (sudoeste) da cidade. Apresenta o menor peridomicílio em comparação aos demais. Possui duas árvores frutíferas médio porte.	Cão (01)

* A quantidade de galinhas nesta residência variou ao longo do estudo, mas sempre esteve acima de 15.

Tabela 1 – Frequência absoluta de flebotomíneos, segundo sexo e local de coleta (bairros), Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Espécies	Locais de Coleta										Total
	Centro		Cristo		Maria		Nova		Popular		
			Redentor		Leite		Corumbá		Nova		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	4
<i>Ev. aldafalcaoae</i>	2	3	1	-	-	1	-	1	-	-	8
<i>Ev. cortelezzii</i>	-	1	-	1	-	1	-	2	-	2	7
<i>Ev. corumbaensis</i>	9	48	21	63	8	22	8	36	10	27	252
<i>Ev. sallesi</i>	1	5	3	3	3	7	-	2	-	2	26
<i>Ev. walkeri</i>	1	1	-	-	-	1	-	2	-	-	5
<i>Lu. cruzi</i>	3.100	548	1.151	233	4.004	417	2.996	511	389	100	13.449
<i>Lu. forattinii</i>	14	9	158	61	17	12	63	114	3	10	461
<i>Mi. peresi</i>	1	2	23	9	1	2	11	8	7	4	68
<i>Mt. oliveirai</i>	-	-	12	3	-	1	1	4	3	3	27
<i>Ny. whitmani</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	2	1	-	-	-	1	-	-	4
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	1	-	1	-	2	-	1	5
Total	3.128	617	1.371	375	4.033	465	3.081	686	412	149	14.317

Br.: Brumptomyia; *Ev.*: Evandromyia; *Lu.*: Lutzomyia; *Mi.*: Micropygomyia; *Mt.*: Martinsmyia; *Ny.*: Nyssomyia; *Pa.*: Psathyromyia; *Sc.*: Sciopemyia.

Tabela 2 - Medidas descritivas para o total de flebotomíneos e para *Ev. corumbaensis*, *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii* segundo local de coleta (bairros), Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Espécie	Local de coleta	Média aritmética	Média Williams	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor*
<i>Ev. corumbaensis</i> (F)	Centro	0,64	0,33	1,28	0	0	8	0,142
	Cristo Redentor	0,84	0,37	1,87	0	0	10	
	Maria Leite	0,29	0,17	0,67	0	0	3	
	Nova Corumbá	0,48	0,25	1,00	0	0	4	
	Popular Nova	0,36	0,20	0,86	0	0	6	
	Total	0,52	0,27	1,22	0	0	10	
<i>Ev. corumbaensis</i> (M)	Centro	0,12	0,07	0,43	0	0	2	0,035
	Cristo Redentor	0,28	0,17	0,58	0	0	2	
	Maria Leite	0,11	0,07	0,39	0	0	2	
	Nova Corumbá	0,11	0,07	0,39	0	0	2	
	Popular Nova	0,13	0,08	0,53	0	0	4	
	Total	0,15	0,09	0,47	0	0	4	
<i>Ev. corumbaensis</i> (MF)	Centro	0,76	0,36	1,50	0	0	9	0,083
	Cristo Redentor	1,12	0,48	2,20	0	0	12	
	Maria Leite	0,40	0,24	0,74	0	0	3	
	Nova Corumbá	0,59	0,30	1,13	0	0	5	
	Popular Nova	0,49	0,26	1,11	0	0	6	

	Total	0,67	0,33	1,44	0	0	12	
<i>Lu. cruzi</i> (F)	Centro	7,31	1,41	10,13	3	0	38	<0,001
	Cristo Redentor	3,11	0,91	5,74	1	0	40	
	Maria Leite	5,56	1,17	12,03	2	0	93	
	Nova Corumbá	6,81	1,32	12,13	3	0	65	
	Popular Nova	1,33	0,59	1,88	0	0	8	
	Total	4,82	1,08	9,51	1	0	93	
<i>Lu. cruzi</i> (M)	Centro	41,33	2,45	96,50	15	0	750	<0,001
	Cristo Redentor	15,35	1,55	34,94	2	0	192	
	Maria Leite	53,39	2,58	112,04	17	0	689	
	Nova Corumbá	39,95	2,36	64,65	8	0	310	
	Popular Nova	5,19	1,20	8,08	2	0	48	
	Total	0,00	0,00	0,00	0	0	0	
<i>Lu. cruzi</i> (MF)	Centro	48,64	2,69	103,60	22	0	787	<0,001
	Cristo Redentor	18,45	1,81	39,95	4	0	232	
	Maria Leite	58,95	2,73	117,22	18	0	696	
	Nova Corumbá	46,76	2,58	73,79	11	0	361	
	Popular Nova	6,52	1,37	9,18	4	0	53	
	Total	35,86	2,24	81,54	7	0	787	
<i>Lu. for</i> <i>att</i> <i>inii</i> (F)	Centro	0,12	0,06	0,57	0	0	4	<0,001

	Cristo Redentor	0,81	0,36	1,85	0	0	12	
	Maria Leite	0,16	0,10	0,49	0	0	3	
	Nova Corumbá	1,52	0,34	6,63	0	0	54	
	Popular Nova	0,13	0,08	0,47	0	0	3	
	Total	0,55	0,19	3,14	0	0	54	
<i>Lu.f orattinii (M)</i>	Centro	0,19	0,08	1,00	0	0	8	
	Cristo Redentor	2,11	0,62	4,45	0	0	24	
	Maria Leite	0,23	0,14	0,56	0	0	3	<0,001
	Nova Corumbá	0,84	0,37	1,82	0	0	10	
	Popular Nova	0,04	0,02	0,26	0	0	2	
	Total	0,68	0,24	2,33	0	0	24	
<i>Lu. forattinii (MF)</i>	Centro	0,31	0,12	1,46	0	0	12	
	Cristo Redentor	2,92	0,83	5,32	1	0	25	
	Maria Leite	0,39	0,22	0,84	0	0	4	<0,001
	Nova Corumbá	2,36	0,56	7,91	0	0	64	
	Popular Nova	0,17	0,10	0,53	0	0	3	
	Total	1,23	0,37	4,47	0	0	64	
Total (F)	Centro	8,23	1,57	10,65	4	0	39	
	Cristo Redentor	5,00	1,20	8,59	2	0	60	<0,001
	Maria Leite	6,20	1,27	12,69	2	0	98	

	Nova Corumbá	9,13	1,50	17,42	4	0	107	
	Popular Nova	1,99	0,76	2,58	1	0	12	
	Total	6,11	1,26	11,69	2	0	107	
Total (M)	Centro	41,71	2,48	96,52	16	0	750	
	Cristo Redentor	18,28	1,82	38,02	4	0	204	
	Maria Leite	53,77	2,60	112,64	17	0	696	<0,001
	Nova Corumbá	41,08	2,45	65,96	9	0	320	
	Popular Nova	5,49	1,25	8,40	3	0	51	
	Total	32,07	2,12	76,31	6	0	750	
Total (MF)	Centro	49,93	2,80	103,90	24	0	789	
	Cristo Redentor	23,28	2,14	44,91	7	0	264	
	Maria Leite	59,97	2,77	118,16	19	0	704	<0,001
	Nova Corumbá	50,21	2,72	79,58	18	0	427	
	Popular Nova	7,48	1,50	9,79	5	0	57	
	Total	38,18	2,38	83,40	10	0	789	

*Teste de Wilcoxon; F = fêmeas; M = machos; MF = soma de machos e fêmeas; *Ev.*: *Evandromyia*; *Lu*: *Lutzomyia*.

Tabela 3 – Medidas descritivas para as variáveis meteorológicas, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Variáveis	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Temperatura					
Dia da coleta	26,10	3,97	27,04	13,77	34,08
7 anteriores	25,71	2,99	26,50	17,75	32,56
15 anteriores	25,61	2,57	26,10	19,59	31,14
30 anteriores	25,65	2,30	25,96	21,40	29,60
Umidade					
Dia da coleta	65,76	14,08	69,46	33,38	89,00
7 anteriores	66,31	12,41	69,03	31,16	86,86
15 anteriores	66,61	12,21	68,55	37,55	85,54
30 anteriores	66,71	11,56	69,48	36,92	85,33

Tabela 4 – Cobertura vegetal, índices de vegetação e umidade e área de superfície impermeável, Corumbá, abril de 2012 a março de 2014.

Variáveis	Locais de coleta				
	Centro	Cristo Redentor	Maria Leite	Nova Corumbá	Popular Nova
Cobertura vegetal (%)	79,34	40,83	57,90	77,34	50,83
NDVI (buffer 100 m)					
Média	-0,01	0,01	-0,06	-0,02	-0,09
Desvio padrão	0,23	0,18	0,18	0,17	0,18
NDVI (buffer 200 m)					
Média	-0,04	-0,01	-0,07	-0,02	-0,07
Desvio padrão	0,23	0,18	0,18	0,15	0,18
NDWI (buffer 100 m)					
Média	-0,12	-0,18	-0,15	-0,18	-0,13
Desvio padrão	0,20	0,15	0,15	0,15	0,16
NDWI (buffer 200 m)					
Média	-0,11	-0,17	-0,14	-0,19	-0,13
Desvio padrão	0,20	0,14	0,15	0,13	0,16
ISA (buffer 100 m)					
Média	0,76	0,83	0,79	0,82	0,73
Desvio padrão	0,25	0,18	0,21	0,20	0,23
ISA (buffer 200 m)					
Média	0,73	0,83	0,75	0,83	0,75
Desvio padrão	0,26	0,18	0,22	0,18	0,23

NDVI: índice de vegetação por diferença normalizada; NDWI: índice de umidade por diferença normalizada; ISA: área de superfície impermeável.

5 CONCLUSÕES

A avaliação dos parâmetros envolvidos na capacidade vetorial de *Lu. cruzi* para *Leishmania (Leishmania) infantum*, bem como sua estimativa numérica, foi realizada por meio de experimentos laboratoriais e de campo. A capacidade vetorial estimada foi de 0,24, sugerindo que no local e período avaliado, a população de fêmeas da área produzam 0,24 novas infecções por dia de exposição de uma fonte de infecção.

A expectativa de vida mediana obtida em laboratório para a população de fêmeas infectadas por *Leishmania (Leishmania) infantum* e por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi de 6,43 e 4,68 dias, com probabilidade de sobrevivência de 0,44 e 0,40, respectivamente. Com relação aos grupos de fêmeas infectadas e não infectadas, observou-se que a presença do parasito parece não influenciar a probabilidade diária de sobrevivência das fêmeas infectadas com *L. (L.) infantum* (p -valor = 0,28). Em contrapartida, as fêmeas infectadas com *L. (L.) amazonensis* apresentaram probabilidade de sobrevivência significativamente maior em comparação com as alimentadas, mas não infectadas (p -valor = 0,02).

A taxa de infecção experimental para *Leishmania (Leishmania) infantum* e por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi de 10,55 e 41,56%. Neste caso, devem ser considerados os diferentes hospedeiros utilizados no xenodiagnóstico, além de questões inerentes a quantidade e distribuição do parasitismo cutâneo. Para ambos os parasitas, em *Lu. cruzi* o período de incubação extrínseco foi de três dias.

Lu. cruzi apresentou elevada antropofilia, também sendo atraído por cães em todos os experimentos conduzidos para avaliar este parâmetro.

Dos 903 espécimes de *Lu. cruzi* submetidos a análise molecular, apenas oito apresentaram DNA de *Leishmania*, identificado posteriormente como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Este é o primeiro relato de infecção natural de *Lu. cruzi* pelo parasito e alerta para a necessidade de identificação do parasito e da cepa responsável pela doença humana e canina observada na região de estudo.

A partir da transmissão de *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via picada, foi possível comprovar a competência vetorial de *Lu. cruzi* para ambos os parasitos.

O padrão da distribuição sazonal das espécies de flebotomíneos demonstrado neste trabalho refletiu-se na distribuição de *Lu. cruzi*, uma vez que esta espécie

representou 93,94% do total capturado em dois anos de coletas semanais. A variação mensal demonstrou que a espécie *Lu. cruzi* tem grande plasticidade e está amplamente adaptada ao ambiente urbano, tendo sido observada em todos os meses de coleta no Município de Corumbá, tanto em períodos secos como em períodos úmidos. Esse fato demonstra que há possibilidade de risco de infecção durante todos os meses do ano com períodos nos quais este risco pode ser maior, alertando para o planejamento e a tomada de decisões para o controle da doença e a adoção de práticas de educação em saúde ambiental junto à população.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 3, p. 207-255.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, P. S.; NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, A. D.; MINZÃO, L. D.; PORTES, F.; MIRANDA, A. M.; FACCENDA, O.; ANDRADE FILHO, J. D. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 304-310, 2010.
- ALONSO, D. P.; COSTA, D. L.; de MENDONÇA, I. L.; COSTA, C. H.; RIBOLLA, P. E. Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 819-821. 2010.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, V. R.; FREITAS, R. A.; BARRETT, T. *Lutzomyia maruaga* (Diptera, Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 251-253, 2008.
- APARICIO, C. **Utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto orbital para análise espacial de paisagem com incidência de leishmaniose tegumentar americana**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 2001.
- APARICIO, C.; BITENCOURT, M. D. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 511-516, 2004.
- ARRUDA, W.; COSTA, F. C.; NAHAS, S.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral americana: constatação de dois casos. **Brasil-Médico**, v. 63, n. 8/9, p. 64-65, 1949.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, 1269-1281, 2000.
- BARCELLOS, C.; BASTOS, F. I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, n. 3, p. 389-397, 1996.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BAUM, M.; CASTRO, E. A.; PINTO, M. C.; GOULART, T. M.; BAURA, W.; KLISIEWICZ, D. R.; COSTA-RIBEIRO, M. C. V. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 143, p. 8-12, 2015.

BECK, L. R.; LOBITZ, B. M.; WOOD, B. L. Remote sensing and human health new sensors and new opportunities. *Emerging Infectious Disease*, v. 6, n. 3, p. 217-227, 2000. BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, 2009.

BOITE, M. C.; MAURICIO, I. L.; MILES, M. A.; CUPOLILLO, E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1888, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

_____. Ministério da Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmanioses no Brasil, período de 1985 a 2005**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

_____. Ministério da Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Leishmaniose Visceral - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>>. Acesso em: fevereiro de 2015, 2015a.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: fevereiro de 2015, 2015b.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 4, p. 257-274.

BRAZIL, R. P.; DE ALMEIDA, D. C.; BRAZIL, B. G.; MAMEDE, S. M. P. O. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. **Parassitologia**, v. 33, supl. 1, p. 113-117, 1991.

BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, S. M. P. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomia mamedei* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 463-464, 1999.

BRITO, V. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; NAKAZATO, L.; DUARTE, R.; SOUZA, C. O.; SOUSA, V. R. F. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

CÂMARA, G.; MONTEIRO, A. M. V. Conceitos básicos em ciência da geoinformação. In: CÂMARA, G.; DAVIS, C. MONTEIRO, A. M. V. (Ed.). **Introdução à ciência da geoinformação**. São José dos Campos: INPE, cap. 2, p. 12-41, 2001.

CARLSON, T. N.; ARTHUR, S. T. The impact of land use - land cover changes due to urbanization on surface microclimate and hydrology: a satellite perspective. **Global and Planetary Change**, v. 25, n. 1-2, p. 49-65, 2000.

CASANOVA, C.; NATAL, D.; SANTOS, F. A. M. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of american cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 42-50, 2009.

CASARIL, A. E.; MONACO, N. Z. N.; OLIVEIRA, E. F.; EGUCHI, G. U.; PARANHOS FILHO, A. C.; PEREIRA, L. E.; OSHIRO, E. T.; GALATI, E. A. B.; MATEUS, N. L. F.; OLIVEIRA, A. G. Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 364, 2014.

CHUST, G.; PRETUS, J. L.; DUCROT, D.; VENTURA, D. Scale dependency of insect assemblages in response to landscape pattern. **Landscape Ecology**, v. 19, p. 41-57, 2004.

COELHO-FINAMORE, J. M.; FREITAS, V. C.; ASSIS, R. R.; MELO, M. N.; NOVOZHILOVA, N.; SECUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; SOARES, R. P. *Leishmania infantum*: lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 333-342, 2011.

COLOSIMO E. A., GIOLO S. R. **Análise de Sobrevida Aplicada**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

CORRÊA, C. C.; PIMENTA, M.; DUTRA, S. L.; MARCO JÚNIOR, P. Utilização do NDVI na avaliação da resposta de besouros herbívoros à complexidade e heterogeneidade ambiental em diferentes escalas no Bioma Cerrado. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2011, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: INPE, 2011, p. 3103.

CORREDOR, A.; GALLEGU, J. F.; TESH, R. B.; PELÁEZ, D.; DIAS, A.; MONTILLA, M.; PALAU, M. T. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 5, p. 480-6, 1989.

CORTADA, V. M. C. L.; DORVAL, M. E. C.; SOUZA LIMA, M. A. A.; OSHIRO, E. T.; MENESES, C. R. V.; ABREU-SILVA, A. L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C. S. F.; CARDOSO, F. O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R. P.; CALABRESE, K. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 365-74, 2004.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO J. M.; PRATLONG, F.; DEDET J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyze *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, v. 55, n. 4, p. 277-283, 2006.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

COX, F. E. Classification and introduction to the parasitic protozoa. In: COX, F. E.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Parasitology**, 10 ed. London: Hodder Arnold Press; 2005. p. 186-99.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. **Hospital**, v. 11, n. 2, p. 3-9, 1937.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H. A General Classification of New World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S. M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1-2, p.145-155, 1995.

DAJOZ, R. **Princípios de ecologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006.

DÁVILA, A. M.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 651-654, 2000.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DEANE, L. M.; GRIMALDI, G. Leishmaniasis in Brazil. In: CHANG, K. P.; BRAY, R. S. (Ed.). **Leishmaniasis**. Amsterdam: Elsevier, 1985. cap. 14, p. 247-281.

DECKER-JACKSON, F. E.; TANG, D. B. Identification of *Leishmania* spp. by radiorespirometry: II. A statistical method of data analysis to evaluate the reproductibility and sensitivity of the technique. In: CHANCE, M. L.; WALTON, B. C. (Eds). **Biochemical Characterization of *Leishmania***. Geneva: Pan American Health Organization; 1982. p. 205-245.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DILLON, R. J.; LANE, R. P. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langerone*. **Parasitology Research**, v. 79, n. 6, p. 492-496, 1993.

DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLILLO, E.; CAMARGO DE CASTRO, A. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 43-46, 2006.

DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; CUNHA, R. V. Modification of Disney trap for capture of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 877-878, 2007.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

EL TAI, N.O; OSMAR, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.H.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

FELICIANGELI, M. D.; RODRIGUEZ, N.; GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 113-120, 1999.

FERREIRA, G. E. M.; dos SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E. C.; RAMOS, T. P. B.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36242, 2012.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: psychodidae, phlebotominae, leishmanioses, bartonelose**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1973.

FRAGA, J., MONTALVO, A.M., DE DONCKER, S., DUJARDIN, J.C., VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238-245, 2010.

FREITAS, R. A.; BARRETT, T. V.; NAIFF, R. D.. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli et al., 1988, a host of *Leishmania amazonensis*, sympatric with two other members of the *Flaviscutellata* complex in southern Amazonas and Rondônia, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, n.3, p. 363-369, 1989.

FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K. P.; DUARTE, A. P. M.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606-612, 2012.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 2, p. 23-51.

GALATI, E. A. B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/egalati/ApostilaPhlebotominae_2014_vol_I.pdf>.

GALATI, E. A. B.; FONSECA, M. B.; MARASSÁ, A. M.; BUENO, E. F. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n. 8, p. 1148-1158, 2009.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; DAMASCENO-JÚNIOR, G. A. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 175-193, 2006.

GALATI, E. A. B.; REGO JÚNIOR, F. A.; NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T. Fauna flebotomínica do município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil e descrição de *Lutzomyia forattinii*, sp. n. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, n.2, p. 261-266, 1985.

GARRET-JONES, C. The human blood index of malaria vectors in relations to epidemiological assessment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 30, n. 2, p. 241-261, 1964.

GOMES, A. C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 67, n. 2, p. 55-60, 1992.

GOMES, A. C.; BARATA, J. M. S.; ROCHA E SILVA, E. O.; GALATI, E. A. B. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 32-39, 1989.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro clínico, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. 1-175, 2009.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HIDE, M.; BAÑULS A. L.; TIBAYRENC, M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. **Parasitology**, v.123, p. 425-432, 2001.

HIRAO, T.; MURAKAMI, M.; IWAMOTO, J.; TAKAFUMI, H.; OGUMA, H. Scale-dependent effects of windthrow disturbance on forest arthropod communities. **Ecological Research**, v. 23, p. 189-196, Jan. 2008.

HUGHES, A.L., PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 4, p. 644-652, 2003.

HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. S. P.; RIBOLLA, P. E.; ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M.; BONAMIGO, R. A.; TASSO JR, N.; OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 470-472, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa da População 2014: Mato Grosso do Sul, Corumbá**. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2014. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/36WA1>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2015.

ILG, T. Proteophosphoglycan of *Leishmania*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 489-497, 2000.

ILG, T.; ETGES, R.; OVERATH, P.; McCONVILLE, M. J.; THOMAS-OATES, J.; THOMAS, J.; HOMANS, S. W.; FERGUSON, M. A. Structure of *Leishmania*

mexicana lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6834-6840, 1992.

ILG, T.; HANDMAN, E.; STIERHOF, Y. D. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Biochemical Society Transactions**, v 27, n. , p. 518-525, 1999.

INFRAN, J. O. M.; SOUZA, D. A.; SOUZA, W. F.; CASARIL, A. E.; EGUCHI, G. U.; OSHIRO, E. T.; FERNANDES, C. E.; OLIVEIRA, A. G. Nycthemeral rhythm of phlebotominae in a maroon area at Piraputanga District, Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. In: **VIII International Symposium on Phlebotomine Sandflies**, Puerto Iguazu, Argentina, 2014, p. 85-P.

JACKSON, P. R.; STITELER, J. M.; WOHLIETER, J. A.; REED, S. G.; BADARÓ, R.; INVERSO, J. A. Characterization of *Leishmania* responsible for visceral disease in Brazil by restriction endonuclease digestion and hybridization of kinetoplastic DNA. In: **11th Congress International Tropical Medicine and Malaria**, Calgary, Canada; 1984, p. 68.

JOHNSON, P.T.; MCCONNELL, E.; HERTIG, M. Natural infections of Leptomonad flagellates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. **Experimental Parasitology**, v. 14, p. 107-122, 1963.

JONES, T. C.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, A. C.; LAGO, E. L.; BADARÓ, R.; CERF, B.; REED, S. G.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANCA, F.; WIESE, K.; GOLIGHTLY, L.; FIKRIG, E.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 1, p. 73-83, 1987.

KAMHAWI, S. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KERR, S. F. Palearctic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 75-80, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. p. 395-460.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales**, v. 78, n. 5, p. 747-755, 1985.

KILLICK-KENDRICK, R. The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v. 132, p. 134-140, 1986.

KILLICK-KENDRICK, R. R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269-276, 1974.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A. J.; READY, P. D.; MOLYNEUX, D. H.; *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 196, n. 1122, p. 105-115, 1977a.

KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.J.; READY, P.D. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 4-5, p. 429-440, 1977b.

KILLICK-KENDRICK, R.; WARD, R. D. Ecology of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 82, p. 143-152, 1981.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11-12, p. 1224-1234, 2005.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 334-343, 2007.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Eds.) **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press; 1979. p. 1-116.

LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 11, n. 1, p. 29-40, 1997.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 385-95, 1968.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Eds.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology**. 10 ed. London: Hodder Arnold ASM Press, 2005. p. 313-49.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonian. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LANE, R. P. Sandflies (Phlebotominae). In: LANE, R. P.; CROSSKEY, R. W. (Eds.). **Medical Insects and Arachnids**. London: Chapman and Hall. 1993. p. 78-119. 1993.

LAWYER, P. G.; YOUNG, D. G.; BUTLER, J. F.; AKIN, D. E. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 3, p. 347-55, 1987.

LAWYER, P. G.; NGUMBI, P. M.; ANJILI, C. O.; ODONGO, S. O.; MEBRAHTU, Y. B.; GITHURE, J. I.; KOECH, D. K.; ROBERTS, C. R. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 1, p. 31-43, 1990.

LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHONIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p.1091-1095, 2011.

LEHANE, M. J. **Biology of blood-sucking insects**. London: Harper-Collins Academic, 1991.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. F.; SOARES, H. S.; SANCHES, C. O.; ACOSTA, I. C.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARTINEZ, E.; LE PONT, F.; TORREZ, M.; TELLERIA, J.; VARGAS, F.; DUJARDIN, J. C.; DUJARDIN, J. P. *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (Le Pont and Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-Andean leishmaniasis focus of Bolivia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 846-9, 1999.

MARZOCHI, M. C. A. Curso: doenças infecto-parasitárias: leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, supl. 2, p. 359-375, 1994.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmaniose visceral humana**. Campo Grande, 2006.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Informe epidemiológico das leishmanioses nº 1/2015**. Campo Grande, 2015.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, v. 128, 263-267, 2004.

McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycolysate phosphatidylinositol in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 294, p. 305-324, 1993.

McFEETERS, S. K. The use of Normalized Difference Water Index (NDWI) in the delineation of open water features. **International Journal of Remote Sensing**, v. 17, n. 7, p. 1425-1432, 1996.

MEDRONHO, R. A. **Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde doença**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995.

MELLO, D. A.; REGO J. R.; F. A.; OSHIRO, E. T.; NUNES, V. L. B. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 259, 1988.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar a Assuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MILES, M. A.; PÓVOA, M. M.; SOUZA, A. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n. 2, p. 243-252, 1980.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G. B. M. L.; MICHALSKY, E. M.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia crluzi* no Município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the Origin and Evolution of the Genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583-588, 2000.

MOMEN, H.; SALLES, C. A. Enzyme markers for *Vibrio cholerae*: identification of classical, El Tor and environmental strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 773-776, 1985.

MOTOIE, G.; FERREIRA, G. E. M.; CUPOLILLO, E.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 1567-1567, 2013.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MYSKOVA, J.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, S. M.; VOLF, P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 317-324, 2007.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percursos**, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NGUMBI, P. M.; LAWYER, P. G.; JOHNSON, R. N.; KIILU, G.; ASIAGO, C. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, n. 4, p. 385-388, 1992.

NOGUCHI, R. C. **Leishmaniose tegumentar americana: estudo de casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante o período de 1976 a 1999**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz/ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

NOVO, E. M. L. M. **Sensoriamento remoto: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2008.

NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n.5, p. 657-661, 1998.

NOYES, H. A.; MORRISON, D. A.; CHANCE, M. L.; ELLIS, J. T. Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 575-578, 2000.

NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINI, L. N.; SANTOS, D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul: estudos na população humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 185-193, 1995.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'ÁURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento do INCRA, Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 299-300, 2001.

NUNES, V. L. B.; YAMAMOTO, Y. Y.; REGO JÚNIOR, F. A.; DORVAL, M. E. C.; GALATI, E. A. B.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 17-21, 1988.

OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 933-944, 2003.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; DORVAL, M. E. C.; FERNANDES, C. E.; OLIVEIRA, G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n. 3, p. 238-241, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M. CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.

OLIVEIRA, E. F. **Aspectos comportamentais de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

OLIVEIRA, E. F. SILVA, E. A.; FERNANDES, C. E. S.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis,

Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 396-401, 2012.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.

OVALLOS, F. G. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fisheri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas**. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2011.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PARANHOS FILHO, A. C. **Sensoriamento remoto ambiental aplicado: introdução às geotecnologias**. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

PCI GEOMATICS. **PCI Geomatica**. Versão 9.1 for Windows. Ontário, Canadá, 2003. 1 CD-ROM.

PESSÔA, S. B.; BARRETTO, M. P. **Leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1948.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: SILVA NETO (Org.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT), 2012.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; MOGI, G. G.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S.; SACKS, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 19, p. 9155-9159, 1994.

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; BLANCO, E. E. N. Interação Vetor-Hospedeiro: Interação *Leishmania*-Hospedeiro invertebrado. In: RANGEL E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 275-289, 2003.

PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J.; McCONVILLE, M.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815. 1992.

PIMENTA, P. F.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359-369, 1997.

PINA, M. F. R. P. Potencialidades dos sistemas de Informações Geográficas na Área da Saúde. In: NAJAR, A. L.; MARQUES, E. C. (Org.). **Saúde e espaço: estudos metodológicos e técnicas de análise**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 6, p. 125-134, 1998.

PINTO, M. C.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; LOZOVEI, A.L.; TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 2, p. 132-139, 2001.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. **Sensoriamento remoto no estudo da vegetação**. São José dos Campos: Parêntese, 2007.

PRATT, D. M.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, v. 291, n. 5816, p. 581-583, 1981.

RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; KAMHAWI, S.; JOSHI, M. B.; REYNOSO, D.; LAWYER, P. G.; DWYER, D. M.; SACKS, D. L.; VALENZUELA, J. G. Characterization of an activated chitinolytic system in the midgut of the sandfly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 6, p. 703-712, 2005.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. Biologia de *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986.

READY, P. D.; ROGERS, M. E. Behaviour of sandflies infected with *Leishmania*. In: KOENRAADT, C. J. M.; TAKKEN, W. (Eds.). **Ecology and Control of Vector-Borne Diseases. Volume 3: Ecology of Vector-Parasite Interactions**. Wageningen: Wageningen Acad. Publ., 2012.

REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: relationship to disease transmission by malaria and arbovirus vectors. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 14, n. 1, p. 67-70, 1989a.

REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: introduction. **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v. 14, n. 1, p. 39-40, 1989b.

RIBEIRO, J. M.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 4, p. 683-686, 1986.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, n. 3, p. 111-125, 1990.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 818-825, 2007.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 498-507, 2002.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sandflies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n.6998, p. 463-467, 2004.

ROSA, R. **Introdução ao sensoriamento remoto**. 5. ed. Uberlândia: UFU, 2003.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; DUNCAN, R. B. JR.; WAKI, K.; CHANG, K. P.; LINDSAY, D. S. Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, suppl. 1, p. 691-693, 2003.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania* Ross. In: SAF'JANOVA, V. M. **The Leishmanias**. Protozoology. Leningrad: Academy of Sciences, URSS All Union Society of Protozoologists, 1982. p. 95-101.

SANT'ANNA, M. R.; DIAZ-ALBITER, H.; AGUIAR-MARTINS, K.; AL SALEM, W. S.; CAVALCANTE, R. R.; DILLON, V. M.; BATES, P. A.; GENTA, F. A.; DILLON, R. J. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 329, 2014.

SANTORO, F.; LEMESRE, J. L.; RIZVI, F. S.; AFCHAIN, D.; SADOGIRSKY, M. Spécificité au niveau de protéines de surface des promastigotes de *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 et *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937. In: Rioux JA, editor. **Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques**. Colloque International; 1984 July 2-6; Montpellier: L'Institut Méditerranéen d'Études Épidémiologiques et Écologiques; 1986. p. 71-6.

SANTOS, M. F. C.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, D. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; CASARIL, A. E.; FERREIRA, A. M. T.; FERNANDES, C. E. S.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, based on microsatellite markers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74268, 2013.

SANTOS DA SILVA, O.; GRÜNEWALD, J. Natural haematophagy of male *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 465-466, 1999.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; HOFFMANN, M. P.; FURLAN, M. B. G.; FERREIRA, W. F.; PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SANTOS, V. C.; ARAUJO, R. A.; MACHADO, L. A. D.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 2792-2798, 2008.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n.1-2, p. 18-24, 2009.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9944-9948, 1992.

SCHOLTEN, H. J.; LEPPER, M. J. C. The benefits of the application of geographical information systems in public and environmental and health, world health statistical. **World Health Statistics Quarterly**, v. 44, n. 3, p. 160-170, 1991.

SCHONIAN, G.; MAURICIO, I. L.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 466-469, 2010.

SCHÖNIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SECUNDINO, N.F.; de FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C.; DAVID, B. A.; PIMENTA, P. F. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 20, 2012.

SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. **Experimental Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 238-242, 2000.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: The ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARRELL, J. P. **World Class Parasites: Leishmania**. London: KAP, 2002. cap. 2, p. 11-32.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: new world. In PETER, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. cap. 7, p. 291-363.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511-511, 1984.

SILVA, E. S.; CARVALHO, F. G.; SILVA, E. A.; FIOZI, E.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: **Congresso Brasileiro da Sociedade de Medicina Tropical**, São Luís, Brasil, 2000, p. 318.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; DE SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* N. SP. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.

SMITH, D. L.; BATTLE, K. E.; HAY, S. I.; BARKER, C. M.; SCOTT, T. W.; McKENZIE, F. E. Ross, Macdonald, and a Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002588, 2012.

SOARES, R. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T.; PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 213-224, 2002.

STUMPF, K. A. The estimation of forest vegetation cover descriptions using a vertical densitometer. In: Society of American Foresters National Convention, 1993, Indianapolis. **The joint inventory and biometrics working groups session at the SAF National Convention**. Indianapolis: Society of American Foresters, 1993. p. 163-169.

SUKMEE, T.; SRIRIPATTANAPIPONG, S.; MUNGTHIN, M.; WORAPONG, J.; RANGSIN, R.; SAMUNG, Y.; KONGKAEW, W.; BUMRUNGSANA, K.; CHANACHAI, K.; APIWATHANASORN, C.; RUJIROJINDAKUL, P.; WATTANASRI, S.; UNGCHUSAK, K.; LEELAYOOVA, S. A suspected new species of *Leishmania*, the

causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 6, p. 617-622, 2008.

TESH, R. B.; CHANIOTIS, B. N.; CARRERA, B. R.; JOHNSON, K. M. Further studies on the natural host preferences of panamanian sandflies. **American Journal of Epidemiology**, v. 95, n. 1, p. 88-93, 1972.

TRAVI B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TUON, F. F.; AMATO NETO, V.; AMATO, V. S. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158-166, 2008.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A.. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 65-94, 1992.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p.421-428, 2005.

VOLF, P.; HAJMOVA, M.; SADLOVA, J.; VOTYPKA, J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 1221-1227, 2004.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **TRENDS in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 91-92, 2007.

VOLF, P.; V. VOLFOVA. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, supl. 1, p. S1-S9., 2011.

WALTERS, L. L.; IRONS, K. P.; MODI, G. B.; TESH, R. B. Refractory barriers in the sandfly (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 2, p. 211-228, 1992.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 5, p. 926-930, 1986.

WASHINO, R. K.; WOOD, B. L. Application of remote sensing to arthropod vector surveillance and control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, supl. 6, p. 134-144, 1994.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.** Geneva: WHO, 2010.

WHO. World Health Organization. **Global Health Observatory Data Repository: leishmaniasis.** WHO, Geneva, Switzerland, 2014.

.

ANEXO A

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 491/2013 da Pesquisadora Alessandra Gutierrez de Oliveira , referente ao projeto de pesquisa, "Capacidade vetorial de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *forattinii* (Diptera: *Psychodidae*) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 12 de março de 2013 .

Joice Stein
Vice-coordenadora da CEUA

Campo Grande, 12 de março de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184

CURRÍCULO LATTES

12/03/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Everton Falcão de Oliveira)

Everton Falcão de Oliveira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4008192346471122>
Última atualização do currículo em 07/01/2015

Possui graduação em Enfermagem pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2008) e mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (2011). Atualmente é doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo e é professor assistente da Faculdade Mato Grosso do Sul (FACSUL). Tem experiência na área de parasitologia, atuando principalmente em estudos sobre as leishmanioses, eco-epidemiologia de vetores, parasitos de interesse em saúde pública e geotecnologias. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Everton Falcão de Oliveira
Nome em citações bibliográficas OLIVEIRA, E. F.; DE OLIVEIRA, EVERTON FALCÃO; DE OLIVEIRA, EVERTON

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Capacidade vetorial de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* e *Lutzomyia (Lutzomyia) forattinii* (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.
Orientador: Eunice Aparecida Bianchi Galati.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva.

2009 - 2011 Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias (Conceito CAPES 4).
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.
Título: Aspectos comportamentais de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na área urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Ano de Obtenção: 2011.
Orientador: Alessandra Gutierrez de Oliveira.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva.

2010 Graduação em andamento em Engenharia Ambiental.
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.

2005 - 2008 Graduação em Enfermagem.
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.

Formação Complementar

2013 - 2013 Introduction to Statistics: Descriptive Statistics.

Eunice Aparecida Bianchi Galati

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1359035734723864>

Última atualização do currículo em 07/12/2014

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.; GALATI, EUNICE A.B.; BIANCHI GALATI, EUNICE APARECIDA; EUNICE APARECIDA GALATI

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617786 Fax: (11) 30617926
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

1983 - 1990	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). 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 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aspectos taxonômicos e biogeográficos do gênero <i>Psychodopygus</i> Mangabeira, 1941 e sua importância epidemiológica (Diptera, Phlebotominae), Ano de Obtenção: 1981. Orientador: Oswaldo Paulo Forattini. Palavras-chave: Taxonomia; Biogeografia; Diptera; Phlebotominae; <i>Psychodopygus</i> . Grande área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes / Especialidade: Entomologia Médica.