Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas

Fredy Galvis Ovallos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do titulo de Mestre em Saúde Pública

Área de Concentração: Epidemiologia

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

São Paulo
2011

Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas

Fredy Galvis Ovallos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do titulo de Mestre em Saúde Pública

Área de Concentração: Epidemiologia

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

São Paulo
2011

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.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquele que foi minha companhia silenciosa em dias frios de trabalho, em momentos de dúvidas e incertezas e que me ensinou que trabalho e humildade são gotas que alimentam a sabedoria do espírito. Ao meu sempre amado irmão Camilo Galvis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, guia silencioso dos meus passos, luz na escuridão e refúgio nas incertezas.

À minha orientadora, grande mestra, exemplo de humildade e sabedoria, pouco poderia ter dado certo sem seu apoio e compreensão.

À minha amada família por seu apoio, amor e fortaleza neste tempo longe de casa.

Ao Dr. José Maria Pacheco de Souza, pelas adequadas correções, esclarecimentos e apoio durante a escrita do documento.

Ao Dr. Cláudio Casanova, da Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo - SUCEN, pelo apoio constante, discussões e reflexões sobre a dissertação.

Ao Dr. Almério de Castro Gomes, pela leitura, discussão e comentários sobre o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio por meio da Bolsa concedida.

À família Galati, que me acolheu em seu lar com alegria e brindou grande apoio.

À Francine Leite, minha companheira, amiga e apoio incondicional, obrigado por estar sempre presente.

Ao Dr. José Rodriguez Neto e aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses do município de Bauru, pela valiosa colaboração nos experimentos de infecção experimental.

À Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, funcionários e alunos do seu grupo de pesquisa, por providenciar os espécimes de *Lutzomyia longipalpis* para criação e captura em cães em Campo Grande, MS.

Ao Dr. Fernando Silveira, pela disponibilização de espécimes da criação de *Lutzomyia longipalpis* do Instituto Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, do estado de Pará.

À Dra. Vânia Lucia Brandão Nunes, da UNIDERP, pelo envio de espécimes de *Lutzomyia longipalpis*.

À Rosane Correa de Oliveira e os demais funcionários do Centro de Controle de Zoonose do município de São Paulo, pela contribuição com os espécimes coletados na Serra da Cantareira.

À Bióloga Mariana Dantas da Silva, estagiária do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae, pelo trabalho dedicado, alegria, esforço e entusiasmo com que desenvolveu todas as tarefas durante a criação dos flebotomíneos em laboratório. Sem a sua colaboração as dificuldades teriam sido maiores. Que a vida lhe recompense!.

À estudante de Biologia Giulia Baldaconi Bispo, estagiária do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae por seu trabalho dedicado.

À Sra. Páscoa A. Bichiatto e funcionários do Centro de Controle de Zoonoses do município de Cotia, pela colaboração nas coletas de flebotomíneos nesta localidade.

Aos Doutores Eduardo Tolezano, Helena Taniguchi, José Augusto de Raeffray, José Eduardo de Raeffray e os funcionários Rui Larosa e Carlos Roberto Elias, do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na coleta de flebotomíneos no município de Bauru, disponibilização de hamsters e realização de testes confirmatórios das amostras de cão.

Aos funcionários do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical pela ajuda e colaboração.

À professora Dra Maria Anice Sallum, pela sua colaboração, ajuda constante e apoio na realização de práticas de Biologia Molecular.

À funcionaria do laboratório de Taxonomia Molecular, Tatiane Oliveira, pela ajuda, colaboração e amizade.

Aos professores da Entomologia, Délsio Natal, Mauro Toledo, José Barata, e funcionários Paulo, Walter, Aristides, Márcia, Rosa e Edna, pela colaboração e ajuda durante meus estudos.

Ao meu amigo Rafael Galati, pela colaboração e ajuda nos experimentos de infecção experimental.

Ao Mestre José Carlos Mosquin, colega e amigo, por sua colaboração e ajuda na coleta de flebotomíneos no começo da pesquisa.

Ao Doutor Andrey José de Andrade pelas considerações, ajuda e amizade.

À família proprietária da residência onde foram realizadas as coletas no município de Embu, pelo carinho com que nos receberam e colaboração.

À minha amiga, Jackeline Fonseca, obrigado pelo apoio incondicional e seus ensinamentos de português.

Aos meus colegas Luis Henrique Bustamante, Paulo Vitor Eufrásio, Guilherme Puglia e Alexandre Arruda pela amizade, conversas, discussões e paciência.

À Fernanda Nascimento, pelo carinho, amizade e colaboração constante.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública LESP/Phlebotominae, Carolina Fordellone, Morgana, Priscila e demais estudantes e estagiários com os quais compartilhei gratos momentos de estudo.

Aos meus colegas e amigos da FSP, Maysa, Sandra, Tatiane, Caio, Denise, Bruna, Frederico, Carolina, Danielle, pelo carinho e amizade.

À Teodora de Paiza Pinheiro, funcionária da secretaria do departamento de Epidemiologia, pela atenciosa leitura do texto.

Às funcionarias da secretaria do departamento de epidemiologia, pelo apoio e colaboração.

A todos aqueles que contribuíram para minha formação.

GALVIS OVALLOS, F. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (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.

RESUMO

Introdução - A leishmaniose visceral no Estado de São Paulo vem acometendo populações caninas e humanas de vários centros urbanos e encontra-se em franca expansão. Desde a sua introdução no Estado de São Paulo, novas áreas na região metropolitana da Grande São Paulo têm sido identificadas com a infecção na população canina e felina, sem que a espécie vetora comprovada, *Lutzomyia longipalpis*, tenha sido encontrada. Diferentemente de outras áreas, onde a transmissão da leishmaniose visceral se dá em ambiente urbano consolidado, na Grande São Paulo, ocorre em ambiente de transição urbano-rural. Neste ocorrem resíduos de matas nos quais os flebotomíneos antropofílicos, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* se desenvolvem. A capacidade vetorial é definida como a taxa diária de picadas potencialmente infectivas que a população de um vetor levará a cabo ao se alimentar em um único tipo de hospedeiro (REISEN, 1989). **Objetivo** – Comparar a capacidade vetorial de *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* oriundas de foco de leishmaniose visceral canina da Grande São Paulo e compará-la com a de *Lu. longipalpis,* proveniente de área endêmica, Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, para a transmissão do agente, *Leishmania (L.) infantum chagasi,* da leishmaniose visceral americana. **Métodos** – A sobrevida infectiva de cada espécie de flebotomíneo foi calculada por meio da estimativa vertical (tábua de vida) de fêmeas de primeira geração cultivadas em laboratório. Os demais parâmetros compreenderam: atratividade do cão doméstico aos flebotomíneos (dado de campo); e, em condições de laboratório: infecção experimental dos flebotomíneos pela *L. (L.) i. chagasi* após sua alimentação em cães infectados, período de incubação extrínseca do parasita e duração

do ciclo gonotrófico. **Resultados** – Em relação aos parâmetros estudados, observou-se respectivamente para *Lu. longipalpis*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*: densidade de fêmeas/cão/dia 3,5, 5,5 e 0,04; proporção de fêmeas alimentando-se no cão 0,71, 0,64 e 0,70; períodos de incubação extrínseca estimados (dias) 7, 4 e 7; mediana do ciclo gonotrófico (dias) 5, 6 e 7, e sobrevida infectiva (dias) 4,13, 0,74 e 2,14. A capacidade vetorial da população de *Lutzomyia longipalpis* foi de 2,02 novas infecções por dia de exposição de um cão infectado. Para *Pintomyia fischeri* este valor compreendeu 0,108 e para *Migonemyia migonei*, 0,0024. **Conclusões**. *Lu. longipalpis* apresenta a capacidade vetorial em relação a *Leishmania infantum chagasi* 18,7 vezes à de *Pi. fischeri* e esta espécie 45 vezes à de *Mg. migonei*. Portanto, no foco de leishmaniose visceral canina da região Embu/Cotia, se demonstrada a competência para as duas espécies de flebotomíneos, *Pi. fischeri* poderia atuar na transmissão desta *Leishmania* em virtude da sua densidade elevada e infecção experimental, enquanto que a participação de *Mg. migonei* parece pouco provável.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, Flebotomíneos, Capacidade vetorial, *Lutzomyia longipalpis*, *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei.*

GALVIS OVALLOS, F. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas./ Study of the vectorial capacity of *Migonemyia migonei* (França) and of *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) as regards *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas. [Dissertação]. São Paulo BR: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2011.

ABSTRACT

Introduction - Visceral leishmaniasis has been affecting canine and human populations in various urban centers in São Paulo state and the area of its distribution has been growing steadily. Since its introduction into the state, the infection has been identified in canine and feline populations of Greater São Paulo. Differently from other areas, where the transmission of visceral leishmaniasis occurs in a consolidated urban environment, in Greater São Paulo it takes place in a transitional urban-rural environment, where in the residual forests the anthropophilic sandflies *Pintomyia fischeri* and *Migonemyia migonei* are found. Vectorial capacity is defined as the daily rate of the potentially infectious bites that a vector population will inflict on one single type of host while feeding on it (REISEN, 1989). **Objective** – To compare the vectorial capacity of *Pintomyia fischeri* and *Migonemyia migonei* from a focus of visceral canine leishmaniasis of Greater São Paulo to that of *Lu. longipalpis* from Campo Grande, an endemic area of the Mato Grosso do Sul state, in terms of the transmission of *Leishmania (L.) infantum chagasi,* the agent of American visceral leishmaniasis. **Methods** – The infective survival time of each phlebotomine species was calculated by means of vertical estimation (life table) of first generation females bred in the laboratory. The other parameters included: the attractiveness of the domestic dog to phlebotomines (field data) and; under laboratory conditions: the experimental infection of phlebotomines by *L. (L.) i. chagasi* after being fed on infected dogs; the extrinsic incubation period of the parasite and the duration of the gonotrophic cycle. **Results** – As regards the studied

parameters were respectively observed for *Lu. longipalpis*, *Pi. fischeri* and *Mg. migonei*: the density of females/dog/day 3.5, 5.5 and 0.04; the proportion of females that fed on the dog 0.71, 0.64 and 0.70; the extrinsic incubation period (days) 7, 4 and 7 (estimated); the median gonotrophic cycle (days) 5, 6 and 7, and the infective survival period(days) 4.13, 0.74 and 2.14. The vectorial capacity of the *Lutzomyia longipalpis* population was calculated as 2.02 new infections per day of the exposure of an infected dog. For *Pintomyia fischeri* this value was 0.108 and for *Migonemyia migonei*, 0.0024. **Conclusions**. The vectorial capacity of *Lu. longipalpis* in relation to *Leishmania infantum chagasi* was 18.7 times that of *Pi. fischeri* and that of this latter species was 45 times that of *Mg. migonei*. Thus, in the focus of visceral canine leishmaniasis in the Embu/Cotia region, if the vectorial competence of the two species be demonstrated, *Pi. fischeri* might be active in the transmission of this leishmania by virtue of its greater density and higher experimental infection rate, whereas the participation of *Mg. migonei* seems unlikely.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, phlebotomines, vectorial capacity, *Lutzomyia longipalpis*, *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 17
1.1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL 17
1.2. VETORES 19
1.3. BIOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS..... 21
1.4. CAPACIDADE VETORIAL 25
1.5. JUSTIFICATIVA 29
2. OBJETIVOS 32
2.1. OBJETIVO GERAL..... 32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
3. MATERIAL E MÉTODOS 33
3.1. DENSIDADE DOS FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO CÃO (m) 33
3.2. OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) - DADOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS: a, b, P, n 34
3.2.1. Locais de Coleta..... 34
3.2.2. Métodos de Coleta 36
3.2.3. Obtenção da Primeira Geração em Condições de Laboratório 37
3.2.3.1. Alimentação Sanguínea das Fêmeas no Laboratório..... 37
3.2.3.2. Individualização das Fêmeas Grávidas e/ou Ingurgitadas 37
3.2.3.3. Transferência dos Ovos 38
3.2.3.4. Alimentação das Larvas 39
3.2.3.5. Seguimento das Formas Imaturas 39
3.3. DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC) 39
3.4. TAXA DE REPASTO SANGUÍNEO EM CÃO (AI) E INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL (b) 40
3.5. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA (e_{inf})..... 42
3.6. DISSECÇÃO DAS FÊMEAS E PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (n)..... 42
3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS 43
3.7.1. Estimativa da Duração do Ciclo de Vida 43
3.7.2. Análise da Mortalidade das Formas Imaturas 43
3.7.3. Expectativa de Vida Infectiva (e_{inf})..... 44
3.7.4. Comparação das Curvas de Sobrevida..... 45
3.7.5. Hábito de Picar o Cão (a) 45
3.7.6. Taxa de Infecção Experimental 46
3.7.7. Proporção de Fêmeas com Formas Infectantes (b) 46
3.7.8. Duração do período de incubação extrínseca (n) 46
3.7.9. Capacidade Vetorial..... 47
3.8. CONDIÇÕES PARA A MANUTENÇÃO DOS INSETOS, ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA 48
3.9. ASPECTOS DA ÉTICA ANIMAL 48
3.10. QUESTÕES DE BIOSSEGURANÇA 49
4. RESULTADOS 50

4.1. DENSIDADE DOS FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AOS CÃES (M) 50
4.2. CAPTURA DE ESPÉCIMES SILVESTRES PARA OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 51
4.3. OBSERVAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS ESTUDADAS E CONSTRUÇÃO DA TÁBUA DE VIDA 53
4.3.1. *Migonemyia Migonei*..... 53
4.3.1.1. Início da Cultura 53
4.3.1.2. Análise da Mortalidade das fases imaturas de *Mg. Migonei*..... 53
4.3.1.3. Sobrevida das fêmeas de *Mg. migonei* ingurgitadas em cão comprovadamente infectado pela *L. i. chagasi* 54
4.3.2. *Pintomyia fischeri* 58
4.3.2.1. Início da Cultura 58
4.3.2.2. Análise da Mortalidade da fase imatura de *Pi. fischeri*..... 59
4.3.2.3. Sobrevida das fêmeas de *Pi. fischeri* ingurgitadas em cão comprovadamente infectado pela *Leishmania infantum chagasi*..... 60
4.3.3. *Lutzomyia longipalpis* 64
4.3.3.1. Início da Cultura 64
4.3.3.2. Análise da Mortalidade na fase imatura de *Lu. longipalpis*..... 65
4.3.3.3. Sobrevivência na Fase Adulta de Fêmeas de *Lu. longipalpis* 67
4.4. COMPARAÇÃO DA SOBREVIDA DAS ESPÉCIES SOB INVESTIGAÇÃO 70
4.4.1. Formas imaturas 70
4.4.2. Adultos - Fêmeas 71
4.5. PROPORÇÃO DE FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM NO CÃO (AI) 72
4.6. DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO 73
4.7. HÁBITO DE PICAR AO CÃO (a)..... 73
4.8. PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (n) 74
4.9. PROPORÇÃO DE FÊMEAS COM FORMAS INFECTANTES ENTRE AS FÊMEAS INFECTADAS (b)..... 75
4.10. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA (e_{inf})..... 75
4.11. CAPACIDADE VETORIAL (V)..... 76
4.11.1. Capacidade Vetorial de *Lu. longipalpis* 77
4.11.2. Capacidade Vetorial de *Mg. migonei*..... 77
4.11.3. Capacidade Vetorial de *Pi. fischeri*..... 77
4.12. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE VETORIAL DAS ESPÉCIES SOB INVESTIGAÇÃO..... 78
5. DISCUSSÃO 79
5.1. DENSIDADE DAS ESPECIES SOB INVESTIGAÇÃO EM RELAÇÃO AO CÃO (m)..... 79
5.2. HÁBITO DE PICAR O HOSPEDEIRO (a) 80
5.3. TAXAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E PROPORCÃO DE FÊMEAS INFECTADAS QUE REALMENTE SÃO INFECTANTES (b) 82
5.4. PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (n) 83
5.5. DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS IMATURAS 84
5.6. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA DO VETOR (e_{inf}) 85

5.7. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE VETORIAL DE *Lu. longipalpis, Pi. fischeri* e *Mg. migonei* 88
CONCLUSÕES 90
REFERÊNCIAS..... 92
ANEXOS 100
ANEXO 1 – Confirmação da Infecção dos Cães Utilizados no Xenodiagnóstico no Presente Estudo 100
ANEXO 2 - Declaração de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Animal, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 102
ANEXO 3 - Declaração de aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP. 103
ANEXO 4 - Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Biossegurança da FSP/USP. 104
CURRICULO LATTES – Fredy Galvis Ovallos 105
CURRICULO LATTES – Profª. Drª. Eunice A. B. Galati 106

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de flebotomíneos, segundo, local de coleta, espécie, sexo e horas de coleta, capturados em canil ou pousados nos cães. 50

Tabela 2. Tempo de coleta, localidades e freqüência das espécies objetos do presente estudo: *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* 52

Tabela 3. Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Migonemyia migonei* em condições de laboratório à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%. 53

Tabela 4. Análise de mortalidade de uma geração de uma coorte de imaturos de *Mg. migonei*. 54

Tabela 5. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 55

Tabela 6. Tábua de vida de uma geração de uma coorte de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 56

Tabela 7. Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Pintomyia fischeri* em condições de laboratório à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%. 59

Tabela 8. Análise de mortalidade de uma geração de uma coorte de imaturos de *Pintomyia fischeri*. 60

Tabela 9. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Pintomyia fischeri* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 61

Tabela 10. Tábua de vida de fêmeas de *Pi. fischeri,* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 62

Tabela 11: Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Lutzomyia longipalpis* em condições de laboratório, à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%. 65

Tabela 12. Tábua de vida temporal de uma geração de uma coorte de imaturos de *Lutzomyia longipalpis* a partir de ovos de fêmeas selvagens de Campo Grande, MS. 65

Tabela 13. Tábua de vida temporal de uma geração de uma coorte de imaturos de *Lutzomyia longipalpis* a partir de ovos de fêmeas da colônia do Instituto Evandro Chagas, procedentes de Barcarena, PA. 66

Tabela 14. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 67

Tabela 15: Tábua de vida de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 68

Tabela 16. Duração da fase imatura em condições de laboratório de *Lu. longipalpis, Mg. migonei* e *Pi. fischeri,* 25ºC (±1ºC), ~ 80% UR. 71

Tabela 17. Valores do χ^2 do teste Log-Rank e os de p, na comparação entre os pares de espécies em estudo..... 72

Tabela 18. Número de machos e fêmeas expostos de cada espécie de flebotomíneo, segundo o tipo de exposição ao cão infectado por *Leishmania i. chagasi,* fêmeas alimentadas ou mortas, e proporção de fêmeas alimentadas..... 72

Tabela 19. Duração do ciclo gonotrófico em condições de laboratório, 25ºC (±1ºC), ~ 80% UR. 73

Tabela 20. Estimativa do parâmetro “a” para cada uma das espécies em investigação. 74

Tabela 21. Proporção de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* com infecção por *Leishmania infantum chagasi*..... 75

Tabela 22. Expectativa de vida para as coortes de espécies de flebotomíneos seguidas a partir do repasto sanguíneo em cão infectado pela *Leishmania infantum chagasi*..... 76

Tabela 23. Resumo dos parâmetros usados na estimativa da capacidade vetorial de *Lu. longipalpis, Mg. migonei* e *Pi. fischeri,* no presente estudo. . 76

Lista de Figuras

Figura 1. Ponto de coleta de *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* no município de Embu, São Paulo. 34

Figura 2. Tubo de acrílico para manutenção de fêmeas grávidas até obtenção das desovas. 38

Figura 3. Gaiola utilizada na realização dos experimentos de infecção experimental dos flebotomíneos em cão infectado por *L. infantum chagasi*.42

Figura 4. Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Mg. Migonei*. (60x). A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 33. E. Larva 4. F. Pupa. 57

Figura 5. Sobrevivência de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 58

Figura 6. Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Pi. fischeri*. (60x).A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 3. E. Larva 4. F. Pupa. 63

Figura 7. Sobrevivência de fêmeas de *Pintomyia fischeri* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi..* 64

Figura 8: Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Lu. longipalpis*. (60x).A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 3. E. Larva 4. F. Pupa. 69

Figura 9. Sobrevivência de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.* 70

Figura 10. Sobrevivência acumulada de *Lu. longipalpis*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* em cultura sob as mesmas condições ambientais e de exposição à fonte alimentar. 71

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são zoonoses cuja etiologia se atribui a várias espécies do gênero *Leishmania,* transmitidas aos vertebrados por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). O parasitismo desses protozoários pode levar a manifestações clínicas nas formas visceral, tegumentar e mucocutânea.

São consideradas doenças emergentes e problemas de saúde pública, devido à gravidade de algumas de suas formas e ampla distribuição no mundo. São 88 os países atingidos, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão, prevalência de 12 milhões de casos, incidência anual de 1-1,5 milhão de novos casos para as formas tegumentares e de 500 mil para a forma visceral (DESJEUX, 2004). Entre os sete países do mundo onde se concentram 90% dos casos da leishmaniose tegumentar, encontram-se o Peru e o Brasil, e entre os cinco países que respondem por 90% dos casos da leishmaniose visceral, apenas o Brasil representa o Continente Americano (WHO, 2011).

Como agente etiológico da forma visceral na América (LVA), tem-se a *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* Cunha & Chagas, 1937 e da leishmaniose tegumentar humana (LTA), pelo menos, 11 espécies (LAINSON e SHAW, 2005).

Embora canídeos silvestres sejam encontrados com infecção por *L. i. chagasi* (DEANE e DEANE, 1955; TOLEZANO et al., 1999) e didelfídeos (SHERLOCK et al., 1984), epidemiologicamente, são os cães domésticos considerados os principais reservatórios deste parasita (LAINSON e SHAW, 2005). Em humanos, a infecção pelo parasita é relativamente frequente entre habitantes de áreas endêmicas. No entanto, as manifestações clínicas clássicas da LVA ocorrem, principalmente, em crianças desnutridas ou em adultos imunodeprimidos (BADARÓ et al., 1986). Trata-se de um problema

de saúde pública devido à gravidade dos casos e incidência em caráter esporádico ou endêmico-epidêmica, atingindo, sobretudo as faixas etárias abaixo dos 10 anos de idade, com 60% dos casos em menores de 4 anos (GOMES et al., 1996). A transmissão autóctone tem sido registrada em 21 dos 27 estados da Federação, em mais de 1.600 municípios, incluindo-se capitais de vários estados (RANGEL e VILELA, 2008; MS, 2011). O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) tem sido apontado como o principal vetor na América (LAINSON e SHAW, 2005).

No Estado de São Paulo, apesar de existirem evidências da transmissão da LVA na Grande São Paulo, desde o final da década de 70 e início de 80 (IVERSSON et al., 1979, 1982), até o final da década de 90, apenas LTA era considerada autóctone. Embora existam relatos da ocorrência do principal vetor do agente da LVA, a *Lu. longipalpis*, em áreas rurais, desde a década de 70 (FORATTINI et al., 1976), foi apenas em 1997 que se identificou a sua presença na área urbana do município de Araçatuba (COSTA et al., 1997). No ano seguinte, surge a identificação dos primeiros casos caninos na cidade e, em 1999, os primeiros casos humanos, cuja etiologia se atribuiu a *L. i. chagasi.* Após isto, tem sido detectada a sua rápida expansão durante a última década, identificando-se casos autóctones humanos e caninos em 54 municípios e, em outros 30 registrou-se somente a transmissão canina (CVE, 2010). Em 2009, foi descrito o encontro de *Lu. longipalpis* e a caracterização da enzootia canina no município de Campinas, e em 2010, a presença do vetor e a transmissão canina nos municípios de Bastos, Brejo Alegre, Palmeira d´Oeste, Presidente Prudente, Presidente Venceslau e Turiúba. Atualmente, a presença do vetor *Lu. longipalpis* tem sido registrada em 108 municípios do estado, 25 destes sem transmissão comprovada.

A expansão da LVA para outras áreas, além da noroeste do Estado, pôde ser confirmada com a identificação de um gato e de três cães com infecção por *L. i chagasi* no município de Cotia, da Grande São Paulo (LINO et al., 2003; SAVANI et al., 2005). A seguir, a infecção canina foi identificada

em outros municípios da Grande São Paulo que estão sob investigação da autoctonia (CVE, 2010).

Distintamente do que ocorre na região noroeste do Estado, cuja transmissão da LVA se dá em ambiente urbano consolidado, na região da Grande São Paulo, a ocorrência tem sido associada a áreas com a presença de matas residuais em uma transição entre urbano e rural, ou mesmo rural. As pesquisas sobre flebotomíneos nos focos de transmissão do município de Cotia (SUCEN, 2005; SILVA, 2005) não revelaram a presença de *Lu. longipalpis* e as espécies capturadas ainda apresentam estreita dependência de matas. Dentre estas, predominaram *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932), *Migonemyia migonei* (França, 1920) e *Psychodopygus lloydi* (Antunes, 1937).

A presença de casos de LVA (caninos e/ou humanos) na ausência do vetor também tem sido observada nos municípios de Embu, Nova Castilho, Barbosa e Jaú. Outros oito municípios encontram-se sob investigação (SUCEN, 2010).

1.2. VETORES

A implicação de uma espécie como vetor de um parasita está ancorada em parâmetros comportamentais da relação inseto-hospedeiro vertebrado-parasita, tais como: hábito alimentar do inseto (no caso da infecção humana, a antropofilia), distribuição geográfica coincidente com a da infecção pelo parasita, densidade elevada - de modo a manter a infecção na natureza, sobrevivência suficiente para garantir o período de incubação extrínseca do parasita, e a competência vetorial demonstrada, que implica na capacidade do inseto de se infectar e transmitir o parasita isolado dos casos humanos (KILLICK-KENDRICK, 1990). Poucas são as espécies para as quais foi possível demonstrar todos esses atributos. Na maioria das vezes, as espécies são apontadas como vetores obedecendo aos critérios da distribuição geográfica coincidente com a da doença, frequência elevada

e antropofilia. Em menor número de vezes, se consegue identificar também a infecção natural do flebotomíneo pelo parasita e, raras vezes, se tem a capacidade vetorial comprovada.

Dentre as cerca de 500 espécies de flebotomíneos descritas para a América (GALATI, 2003), aproximadamente 10% delas têm sido implicadas na transmissão de leishmanioses (CIPA GROUP, 1999). Segundo a classificação de GALATI (2003), que divide os flebotomíneos americanos em 23 gêneros, os vetores de leishmânias estão distribuídos principalmente em sete deles: *Bichromomyia, Lutzomyia, Migonemyia, Nyssomyia, Pintomyia, Psychodopygus* e *Trichophoromyia*.

Na América, *Lu. longipalpis,* com distribuição que vai do México à Argentina, ocupando principalmente áreas de formações vegetais abertas (savanas e caatingas) tem sido considerada como o principal vetor da *L. i. chagasi*, sobretudo pela sua adaptação às áreas endêmicas urbanas (RANGEL e VILELA, 2008). Todavia, em área ao norte da Colômbia e Venezuela, *Pintomyia evansi* (Nunez-Tovar, 1924) atua como o principal vetor (BEJARANO et al., 2001). Em Mato Grosso do Sul, nas cidades de Corumbá e Ladário, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) tem sido apontada como o principal vetor (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998; PITA PEREIRA et al., 2008) e *Lutzomyia forattinii* Galati Rego Jr, Nunes & Teruya, 1985 com papel secundário na transmissão (GALATI et al., 1997 e PITA-PEREIRA et al., 2008). Ainda neste estado, na Serra da Bodoquena, ao lado de *Lu. longipalpis, Lutzomyia almerioi* Galati & Nunes, 1999 também parece atuar na transmissão (SAVANI et al., 2009). Em área endêmica de Belo Horizonte, MG, *Evandromyia cortelezzii* (Bréthes, 1923) foi encontrada com infecção natural por este parasita; todavia, não existem evidências que tenha importância na transmissão para o homem (CARVALHO et al., 2008) e em Pernambuco, *Mg. migonei* foi encontrada naturalmente infectada por esse parasita (CARVALHO et al., 2010).

1.3. BIOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS

As formas imaturas de flebotomíneos desenvolvem-se em solo úmido, rico em matéria orgânica e ao abrigo da luz solar direta (FORATTINI, 1973). Tais condições geralmente estão presentes nas florestas, cavernas e determinados ambientes antrópicos, incluindo áreas urbanas. A duração do ciclo de vida pode variar em função de fatores como temperatura, umidade relativa e disponibilidade de alimento. ENDRIS et al. (1984) observaram para *Dampfomyia anthophora* (Addis, 1945) a 20°C, um período médio de 83,3; 9,3 dias; a 24°C (49,5 ; 2,0 dias); a 28°C (39,1; 2,9 dias) e a 32°C(33,5; 3,7 dias). ANDRADE FILHO et al. (2004), em temperaturas variando entre 25-260C, observaram para *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), média de 34,9 dias e para *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), 45,1 dias. Rangel et al. (1985), a 25°C, com quatro tipos distintos de alimentação das fêmeas, observaram para *Ny. intermedia*, média de 38,5 dias e para *Lu. longipalpis*, média de 32,5 dias.

Os adultos costumam se abrigar nos locais protegidos do vento, sol e presença de alta umidade. Deslocam-se em vôos curtos e também caminham sobre superfícies, muitas vezes aos saltinhos. Dispersam de modo a não se afastarem muito de seus abrigos, cujos estudos de marcação, soltura e recaptura revelaram que a maior parte é recapturada a menos de 250 m do ponto de soltura (MORRISON et al., 1993; CASANOVA et al., 2005; GALATI et al., 2009).

Apenas as fêmeas praticam hematofagia em um largo espectro de hospedeiros, incluindo animais de sangue frio, aves e mamíferos (YOUNG e DUCAN, 1994). O primeiro repasto sanguíneo ocorre, geralmente, a partir do segundo ou terceiro dias após a eclosão. Fêmeas nascidas em laboratório, inicialmente, tendem a recusar a alimentação sanguínea, mas quando lhes oferecem solução açucarada se alimentam avidamente. No entanto, parece que o açúcar as estimula para o hematofagismo e, quando se alterna a alimentação com sangue e açúcar, ocorre um aumento da longevidade (BARRETTO, 1942). As fêmeas que sobrevivem à oviposição, geralmente,

após este evento, procuram avidamente um novo repasto; no entanto, algumas fêmeas grávidas podem se realimentar antes da postura. O tempo que decorre entre a ingestão sanguínea e a oviposição pode variar de 3 a 13 dias, com as maiores frequências observadas entre 7-10 dias (BARRETTO, 1942). CASANOVA et al. (2009) observaram para *Ny. neivai*, em campo, um período do ciclo gonotrófico de 4,0 dias.

A estimativa da sobrevida do vetor é um parâmetro essencial, porque indica a fração da população que poderá ser infectante (MILBY e REISEN, 1989).

A estimativa da sobrevida pode ser feita horizontalmente ou verticalmente. Horizontalmente, a estatimativa é feita por meio de experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura, calculando-se a sobrevida, com base no declínio do número de espécimes recapturados em dias consecutivos. Esta metodologia assume que os mosquitos, após a marcação, permanecem marcados durante o tempo de vida, que podem ser amostrados com igual eficiência em cada dia de vida, as perdas por migração são mínimas e que a marcação não altera a sobrevida e comportamento dos mesmos. Desta maneira, se adota que a proporção diária de sobreviventes (**s**) é constante durante o período de recaptura.

Assim, o número de mosquitos marcados e recapturados a cada dia (m_t) expressa-se como uma função de **s**, segundo a equação:

$$m_t = M_0 \, r \, s^t$$

onde:

M_0 = número de mosquitos liberados

r = taxa de recaptura

t= tempo desde a liberação

A forma logarítmica dessa expressão pode ser usada para estimar o valor de **s,** usando uma regressão de mínimos quadrados, segundo a equação:

$$\ln m_t = \ln M_0 \, r + t \ln s$$.(MILBY e REISEN,1989).

O valor da proporção diária de sobreviventes é estimado como o antilog do coeficiente de regressão, segundo a equação **s** = $\mathbf{e^b}$, sendo **e**, a base do logarítmo natural e **b**, o coeficiente de regressão obtido por meio do número de insetos marcados e recapturados nos dias subseqüentes à liberação pós-marcação (CASANOVA, 2001). No presente trabalho a denotação "**S**" foi considerada como **P.**

A estimativa vertical pode ser feita mediante a construção da tábua de vida, estimando-se a proporção de indivíduos que sobrevivem a um evento crítico, como por exemplo, a oviposição, no caso das fêmeas. Em culicídeos, a estimativa vertical da sobrevida também pode ser obtida como a taxa de fêmeas multíparas (estimada mediante dissecção das fêmeas e observação do ovaríolos, para avaliação do número de oviposições) em relação à duração do ciclo gonotrófico. No entanto, está prática em flebotomíneos é pouco aplicável e pode ser influenciada pelo erro de observação, considerando-se o pequeno tamanho dos ovários da fêmea.

Em estudo de captura-marcação-soltura-recaptura, CASANOVA et al. (2009) estimaram para fêmeas de *Ny. neivai* uma expectativa média de vida de 2,54 dias e sobrevida diária (**P**) de 67%. Da mesma forma, GALATI et al. (2009) estimaram uma sobrevida diária de 57% para fêmeas de *Ny. intermedia* e 64% para as de *Ny. neivai*.

A construção da tábua de vida permite descrever em forma detalhada a mortalidade de uma coorte, segundo o risco de morte, e outros parâmetros calculados em cada intervalo de idade. Para isto, os indivíduos de uma coorte de igual idade são acompanhados, registrando-se o número de mortes em cada específico intervalo de tempo, até a morte de todos os indivíduos (CAREY, 1993). Com esta metodologia, BARRETTO (1942) estimou uma expectativa média de vida ao nascer (e_0) e probabilidade de sobrevivência média diária (**P**) para duas espécies de *Nyssomyia*, observando variação em função da alimentação e fecundação das fêmeas: para as não alimentadas esses valores foram, respectivamente: (e_0) = 4,91 dias, P = 0,61, alimentadas apenas com solução de açúcar (e_0 = 9,58 dias e

P = 0,78), apenas com sangue (e_0 = 13,54 dias e P = 0,81), alimentadas alternativamente com sangue e açúcar (e_0 = 17,45 dias e P = 0,84); para a condição, fecundação das fêmeas: fecundadas (e_0 = 13,11 dias e P = 0,81) e não fecundadas (e_0 = 16,34 dias e P = 0,83).

Considerando-se que a leishmânia só pode ser transmitida pelas fêmeas que realizaram a hematofagia, a análise de sobrevida deve ser estruturada com base em uma coorte de fêmeas após o repasto em uma fonte sanguínea.

A infecção do flebotomíneo por leishmânia dá-se quando a fêmea ao se alimentar em um mamífero infectado ingere macrófagos com as formas amastigotas. Estas, no tubo digestivo do flebotomíneo, se adaptadas ao meio, sofrerão a metaciclogênese, passando por várias formas, com a maioria se transformando em metacíclicas, que são as infectantes para os mamíferos. A metaciclogênese pode ocorrer num período entre 2 a 5 dias (KAMHAWI, 2006). Todavia, para *Ny. intermedia*, RANGEL et al., (1992) observaram experimentalmente infecção maciça por *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911 na válvula estomodeal, 5-6 dias após o repasto infeccioso e CASANOVA et al. (2009), para *Ny. neivai*, 8 dias após o repasto infeccioso e pelo menos 3-4 dias após a digestão do sangue.

A transmissão das promastigotas dar-se-á quando o inseto infectado ao picar um hospedeiro regurgitará formas metacíclicas, juntamente com o sangue; este devido ao bloqueio do gel secretado pelas promastigotas tem sua passagem impedida através do canal alimentar (KAMHAWI, 2006).

A taxa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania sp*. varia em função do nível de circulação do parasita na biocenose. Em focos de leishmaniose tegumentar, por meio de dissecção, têm sido observadas taxas de infecção natural por flagelados próximas a 0,2% (BARRETTO, 1943; GALATI et al., 1996), em focos de leishmaniose visceral, observou-se até cerca de 7% (LAINSON et al., 1985). Todavia, com o emprego de testes moleculares essas taxas podem ser mais elevadas (PITA-PEREIRA et al., 2005; PAIVA et al., 2007).

1.4. CAPACIDADE VETORIAL

A capacidade vetorial de uma espécie de inseto hematófago (**V**) define-se como a taxa diária de picadas potencialmente infectivas que a população de um vetor levará a cabo ao se alimentar em um único tipo de hospedeiro (REISEN, 1989).

Como parâmetros para identificar a capacidade vetorial de uma determinada espécie em relação a um agente, além da distribuição coincidente com a da infecção, são considerados a densidade da espécie em relação a um hospedeiro, o hábito de picar um determinado hospedeiro, a proporção de insetos infectados que realmente são infectantes, o período de incubação extrínseca, probabilidade de sobrevida diária e a expectativa média de vida da população de fêmeas.

A partir de estudos da malária, que se pressupunha o homem como único hospedeiro do parasita, foram desenvolvidas equações que permitem estimar a capacidade vetorial de uma determinada população. Uma versão delas (REISEN,1989) é apresentada a seguir:

$$V = \frac{(m)(a)\ P^{n} b}{-\log_{e} P} = (m)(a)(P^{n})(e_{0})(b)$$

Onde:

V = capacidade vetorial.

m = densidade do vetor em relação ao hospedeiro, expressado como fêmeas por hospedeiro por dia.

a = hábito de picar o hospedeiro. Pode ser estimado mediante a expressão AI/GC, onde AI é a proporção de fêmeas se alimentando no hospedeiro e GC é a duração do ciclo gonotrófico. O valor de **a** é uma estimativa da proporção de repastos que a população de um vetor obtém de um hospedeiro por dia.

P = probabilidade de sobrevivência diária do vetor, calculada horizontalmente é assumida como uma constante. Assim a expectativa de vida do vetor $\mathbf{e_0 = 1/- \log_e P}$

n = duração do período de incubação extrínseca, tempo em dias, entre a alimentação na fonte infectante e o desenvolvimento das formas infectivas. Considerando-se que a probabilidade de sobrevivência diária é constante, assim $\mathbf{P^n}$ indicará a probabilidade de sobrevivência no dia que o mosquito se torna infectivo, e a expectativa da vida infectiva será obtida pela expressão $\mathbf{P^n/- \log_e P = e_{inf}}$

b = proporção de vetores portando um agente infeccioso que efetivamente é infectivo.

A densidade do vetor em relação ao hospedeiro (**m**) estima o número de insetos em relação a um hospedeiro em determinada área, pressupondo que a densidade estimada, seja representativa da área estudada.

O hábito de picar o hospedeiro (**a**), estimado com a razão AI/GC, indica a proporção de mosquitos de uma população que fazem o repasto sanguíneo em um hospedeiro Este índice aplica unicamente para as espécies coletadas em uma área definida durante um período de tempo específico.

Com a estimativa deste parâmetro se obtém a freqüência de contato entre o vetor e o hospedeiro, pois a taxa de alimentação permite estimar quantas fêmeas em uma dada população conseguem se alimentar em um hospedeiro, e o ciclo gonotrófico determina a freqüência com a qual um novo repasto será procurado pelo vetor.

Probabilidade de sobrevida diária do vetor (**P**). A estimativa deste parâmetro é fundamental, pois dela dependerá a fração da população de fêmeas que poderá transmitir o agente, considerando-se a duração média esperada do período de incubação extrínseca. Além disso, a produção de

ovos e estabilidade da população dependerão da taxa de sobrevida das fêmeas.

Duração do período de incubação extrínseca (**n**)**.** Este dado permite estimar em dias, o tempo necessário para o desenvolvimento das formas infectantes no vetor, após o repasto infectante. Pode ser estimado de duas maneiras: a) diretamente, mediante a dissecção diária de fêmeas após o repasto infectante e observação dos parasitas e b) indiretamente, considerando-se a duração mediana, em dias, do ciclo gonotrófico, pressupondo concordância entre o desenvolvimento do agente até a forma infectante e um novo repasto do vetor. Quando se é necessária a demonstração da competência vetorial, a utilização da segunda alternativa teria a vantagem de preservar mais fêmeas supostamente infectivas para o repasto em hospedeiro suscetível.

Em experimentos de marcação-soltura e recaptura, em campo, assumindo que a taxa de mortalidade não se altera com a idade, a probabilidade de um mosquito sobreviver através de **t** dias é calculada segundo a expressão $\mathbf{P^t}$ e, a expectativa de vida $\mathbf{e_0}$ como $\mathbf{1/- \log_e P}$. Com isto em mente, a probabilidade de sobrevivência de uma espécie de mosquito no momento que que se torna infectivo pode ser calculada como $\mathbf{P^n}$**,** sendo **n** a duração em dias do período de incubação extrínseca ou do ciclo gonotrófico, e a expectativa de vida infectiva de um mosquito $\mathbf{e_{inf}}$, pela expressão $\mathbf{P^n /-\log_e = e_{inf}}$**.**

Diferentemente do modelo tradicional de capacidade vetorial exposto anteriormente, a estimativa dos parâmetros de sobrevida em laboratório requer uma reestruturação da equação original descrita em REISEN (1989). Isto porque com a construção da tábua de vida e dissecção diária das fêmeas é possível se obter o intervalo entre o repasto infectante e o surgimento das formas infectivas no tubo digestivo dessas, ou seja, o período de incubação extrínseca (**n**). Desta maneira, a expectativa de vida infectiva **($\mathbf{e_{inf}}$)** pode ser obtida diretamente do acompanhamento da coorte.

a capacidade vetorial (V) pode ser expressa como**:**

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

m = densidade do vetor em relação ao hospedeiro, expressado como fêmeas por hospedeiro por dia.

a = proporção de repastos que a população de um vetor obtém de um hospedeiro por dia. Este valor é obtido da divisão da taxa de repasto em cão pela duração do ciclo gonotrófico.

b = estimado pela proporção de fêmeas com formas promastigotas metacíclicas no tubo digestivo torácico. Esta estimativa permite identificar a parcela das fêmeas com potencial infectivo do total das fêmeas que adquiriram a infecção. Este parâmetro está diretamente ligado à probabilidade de sobrevida, pois, ainda que a taxa de infecção seja alta, da primeira, dependerá a fração de fêmeas infectivas.

$\mathbf{e_{inf}}$ **=** índica a expectativa de vida da população de fêmeas desde o momento em que desenvolve as formas infectivas. Mediante a construção da tábua de vida de uma geração, é possível estimar a sobrevida da população em intervalos de tempo específicos (intervalo de 1 dia); assim, a expectativa de vida infectiva pode ser obtida diretamente no intervalo correspondente ao dia em que formas infectivas do parasita surgiram (duração do período de incubacão extrínseca) ou indiretamente, no intervalo correspondente à duração do ciclo gonotrófico, assumindo-se concordância entre o surgimento das formas infectivas e a oviposição. Seu calculo é realizado com o acompanhamento de uma coorte de fêmeas após sua alimentação em um hospedeiro e construindo a tábua de vida. Estimado o período de incubação extrínseca, adota-se o valor de

expectativa de vida da coorte no dia em que as formas infectivas foram observadas.

1.5. JUSTIFICATIVA

Embora se conheçam os aspectos epidemiológicos das leishmanioses e o papel dos flebotomíneos na transmissão de várias espécies de leishmânias na América, a capacidade vetorial dos insetos suspeitos ou comprovados não tem sido avaliada (CASANOVA et al., 2009).

Algumas espécies de flebotomíneos não reconhecidas como vetores de *Leishmania spp* desenvolvem experimentalmente (ROGERS e BATES, 2007; PAIVA et al., 2007; SANTOS, 2007;) ou naturalmente (CARVALHO et al., 2008; SAVANI et al., 2009) infecção pelos parasitas. Estas observações têm levado alguns autores a sugerir a participação de outras moléculas que não a lipofosfoglicana (que permite a fixação dos flagelados no tubo digestivo dos flebotomíneos), ou outros mecanismos que podem atuar neste processo, de modo que os flagelados persistam no tubo digestivo após a eliminação do sangue ingerido e degradado, reforçando o conceito de vetores permissíveis, em contrapartida aos vetores específicos (VOLF e MYSKOVA, 2007; MYSKOVA et al., 2007).

O encontro de infecção natural em flebotomíneos que podem ser encaixados no conceito de vetores permissíveis traz à tona a necessidade de se investigar outras espécies que poderiam atuar na transmissão dos agentes das leishmanioses. Neste sentido, são de particular interesse, espécies que possam atuar na cadeia de transmissão do agente da LVA, onde a infecção se faz presente, e, no entanto, *Lu. longipalpis*, vetor comprovado, não tem sido encontrada. São exemplos desta situação, registro de casos de LVA em humanos na Grande São Paulo no final da década de 70 e início da de 80 (IVERSSON et al., 1979, 1982), entre a população felina e canina no município de Cotia e Embu na Grande São Paulo (LINO et al., 2003; SAVANI et al., 2005, CVE, 2010), e ainda a suspeita de autoctonia da infecção em vários outros municípios da Grande

São Paulo (SUCEN, 2010). Em algumas dessas áreas o vetor *Lu. longipalpis* foi pesquisado e não encontrado (IVERSSON et al., 1979, 1982; SILVA, 2005; SUCEN, 2010).

A detecção dos chamados vetores permissíveis é de particular interesse no caso da LVA, uma vez que o programa de controle desta doença no Brasil está em grande parte centrado na presença do reconhecido vetor, *Lu. longipalpis* (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2006). Evidentemente, não se pode deixar de considerar a importância desta espécie, uma vez que a sua adaptação ao ambiente urbano tem possibilitado a expansão e aumento da incidência da doença nas populações humana e canina.

No caso particular das áreas de transmissão da Grande São Paulo, as espécies de flebotomíneos capturadas foram: *Pi. fischeri, Pi. monticola, Mg. migonei e Ev. cortelezzii* (IVERSSON et al., 1979, 1982; SUCEN, 2005). Destas, merecem destaque *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* por serem antropofílicas e estarem amplamente distribuídas no estado de São Paulo (CAMARGO-NEVES et al., 2002). *Pi. fischeri* foi apontada por BARRETTO (1943) como possível vetora do agente da leishmaniose tegumentar devido à sua capacidade de se infectar experimentalmente (PESSOA e COUTINHO, 1941), alta antropofilia e abundância no interior dos domicílios e de abrigos de animais domésticos, quando situados até 80m das matas. Recentemente, no estado do Espírito Santo, esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis*, um dos agentes da LTA (ROCHA et al., 2010). *Mg. migonei* já foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis* no Nordeste e Sudeste do Brasil (QUEIROZ et al., 1994; PITA-PEREIRA et al., 2005). No estado de São Paulo, esse flebotomíneo, em análise de regressão multivariada, foi associado aos mais elevados coeficientes padronizados de incidência média acumulada da leishmaniose tegumentar (CAMARGO-NEVES et al., 2002).

Embora *Pi. fischeri* tenha apresentado dominância em relação a *Mg. migonei* na região da Grande São Paulo, a comparação da capacidade vetorial, além da densidade envolve outros parâmetros. Assim, considera-se

relevante a comparação de ambas em condições laboratoriais com a *Lu. longipalpis* em relação aos parâmetros relativos ao hábito de se alimentar em hospedeiros da *L. i. chagasi*, a sobrevida, a taxa de infecção e período de incubação extrínseca.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar em condições de laboratório a capacidade vetorial de *Pintomyia fischeri* e de *Migonemyia migonei* provenientes de área com transmissão de leishmaniose visceral canina na Grande São Paulo, comparando-as com a *Lutzomyia longipalpis,* reconhecido vetor da *Leishmania* (*L*.) *infantum chagasi.*

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em relação às três espécies de flebotomíneos envolvidas no experimento:

- estimar a densidade em relação ao cão;
- estimar a mortalidade e duração do ciclo de vida das formas imaturas;
- estimar a probabilidade de sobrevida diária e expectativa média de vida das fêmeas após repasto infectante;
- estimar a duração do ciclo gonotrófico;
- calcular a taxa de repasto em cão;
- estimar a taxa de infecção experimental pela *L. i. chagasi;*
- estimar o período de incubação extrínseca da *leishmania i. chagasi;* e
- estimar a capacidade vetorial para *L*. *i. chagasi.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DENSIDADE DOS FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO CÃO (m)

A obtenção das informações sobre este parâmetro foi realizada por meio de capturas de fêmeas de *Pi. fischeri, Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* em cão ou pousadas nas paredes do canil.

As coletas foram realizadas durante o verão e a primavera, épocas de maior atividade dessas espécies (BARRETTO, 1943; FORATTINI, 1973). Foram coletados com aspirador manual, quando pousados nos cães ou nas paredes do canil, durante 5 minutos em intervalos de 15 minutos.

As coletas de *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* foram realizadas no município de Embu, estado São Paulo, onde estas espécies apresentam densidades elevadas (SUCEN, 2005). O canil consta de baias abrigando dois cães cada uma delas. Encontra-se localizado próximo à margem de mata residual conservada, sob as coordenadas geográficas 23° 37.656' S, 46° 53.164' O (Fig. 1).

As coletas de *Lu. longipalpis* foram realizadas em canil com dois cães, em uma residência da zona urbana, localizada no bairro Pioneiros da cidade de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul.

Os insetos coletados foram identificados segundo GALATI (2003), e a densidade relativa para cada espécie foi calculada pelo número de fêmeas/número de cães/dia.

Levando-se em conta que estes insetos apresentam atividade hematofágica noturna e que em estudos preliminares na Grande São Paulo, com coletas em armadilhas de Shannon realizadas das 18:00 - 06:00 horas, 86% das fêmeas de flebotomíneos foram capturados entre 19:00-23:00 horas (GALATI 2005, dados não publicados), adotou-se o valor da densidade obtido entre as 20:00 e 23:00 horas como representativas da

densidade por dia.

Figura 1. Ponto de coleta de *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* no município de Embu, São Paulo.

3.2. OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) - DADOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS: a, b, P, n

3.2.1. Locais de Coleta

Pintomyia fischeri. Foram realizadas aproximadamente duas coletas por mês, no período compreendido entre março de 2010 a maio de

2011. Os espécimes foram capturados em áreas próximas ou no interior de matas na Grande São Paulo, nos municípios de Cotia, Embu e São Paulo. Em Cotia, as coletas foram realizadas na Sede da Associação de Assistência Social Recanto da Vovó, no Embu, à Rua Cumbica (cerca de 2 km m da área de Cotia) e em São Paulo, no Parque Estadual da Cantareira. Nesses municípios esta espécie ocorre em densidades relativas próximas a 90% (SILVA, 2005, SUCEN, 2005, MOSCHIN, 2010).

Migonemyia migonei. Embora SILVA (2005) tenha capturado esta espécie em Cotia com frequência relativamente elevada (15,35%), nas coletas do presente estudo, neste município e em Embu, a densidade relativa foi inferior a 2%. Em face desta escassez de espécimes, e informações de um pesquisador da Superintendência de Controle das Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN) - Casanova - de que a mesma é abundante em Mogi Guaçu, seis coletas foram realizadas neste município situado a nordeste do estado de São Paulo. As coletas ocorreram em uma chácara localizada nas coordenadas geográficas 22°20.041´ S, 46°50.755´ O, com a presença de mata residual, no período compreendido entre fevereiro e maio de 2011.

Lutzomyia longipalpis. Uma tentativa de captura desta espécie foi realizada no município de Bauru, noroeste de SP, por três dias consecutivos, em março de 2010, com escassos resultados. Devido às incertezas nas coletas de um número suficiente de espécimes para dar início à criação da espécie, além das dificuldades de mobilização para esta área, buscou-se colaboração para captura de fêmeas silvestres no estado de Mato Grosso do Sul (MS), junto a pesquisadores da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Uma coleta foi realizada em janeiro 2011, no município de Bonito e outra, em Campo Grande, em fevereiro de 2011. Além disso, obteve-se colaboração de pesquisadores do Instituto Evandro Chagas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, no Estado do Pará (PA), que forneceram, em fevereiro de 2011, aproximadamente 400 pupas da 38ª geração da colônia desta espécie, procedente de Barcarena, PA.

3.2.2. Métodos de Coleta

Para a captura dos flebotomíneos, os seguintes métodos foram empregados:

a) Armadilhas automáticas luminosas. Câmaras coletoras foram adaptadas de modo a permitir a sobrevivência dos insetos. As armadilhas foram instaladas em anexos peri-domiciliares ou resíduos de mata durante toda a noite. Pela manhã, as gaiolas foram retiradas envoltas com uma toalha molhada e cobertas com um plástico de modo a manter a umidade. Nas coletas realizadas na região da Grande São Paulo, as gaiolas foram imediatamente transportadas para o insetário do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae (LESP/Phlebotominae) da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Nas de Mogi Guaçu, as gaiolas foram transportadas até o Laboratório de Entomologia SUCEN – regional de Mogi Guaçu, onde os insetos foram colocados em caixas térmicas adaptadas para seu transporte até o LESP/Phlebotominae; na coleta de Bonito, as gaiolas foram levadas ao laboratório de Parasitologia da UNIDERP, onde os insetos foram acondicionados em recipientes lacrados, acondicionados em caixa de papelão e enviados, via aérea, ao (LESP/Phlebotominae). Na de Campo Grande, as gaiolas foram transportadas ao insetário do Departamento de Patologia da UFMS, onde as fêmeas foram alimentadas em hamster. A seguir, transferidas individualmente para frascos plásticos tampados com um tecido de nylon e sobre este uma tampa plástica, tendo um furo em seu centro. Estes frascos foram acondicionados em uma caixa de isopor tendo papel úmido em seu fundo. A caixa foi lacrada e enviada por transporte aéreo para o LESP/Phlebotominae.

b) Armadilhas de Shannon modificadas. Armadilhas modificadas nas cores branca e preta (GALATI et al., 2001) foram instaladas das 18:00 às 23:00 horas em áreas próximas ou no interior da mata em Cotia, Embu e São Paulo (Serra da Cantareira). Dois indivíduos realizaram a coleta dos

insetos com aspirador de Castro, liberando-os posteriormente em uma gaiola de 20x30 cm. Esta gaiola foi coberta com um pano úmido e colocada em uma caixa térmica de isopor revestida internamente com uma camada de gesso de 3 cm para manter a umidade do microambiente. A caixa foi vedada e transportada ao LESP/Phlebotominae.

3.2.3. Obtenção da Primeira Geração em Condições de Laboratório

A obtenção da primeira geração das espécies objeto de estudo em condições de laboratório foi realizada mediante método modificado do empregado por KILLICK-KENDRICK e KILLICK-KENDRICK (1991), conforme descrito a seguir:

3.2.3.1. Alimentação Sanguínea das Fêmeas no Laboratório

A alimentação das fêmeas de campo foi feita em hamster ou em codorna. O hamster foi anestesiado e colocado dentro da gaiola contendo os insetos. A anestesia foi realizada por injeção intramuscular de uma dose máxima de 0,25 ml de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina 2%, em uma diluição 1:10, respectivamente. O tempo máximo de exposição do hamster foi de 50 minutos. Quando alimentadas em codorna, esta foi imobilizada por meio de uma tela e colocada no interior da gaiola por 50 minutos.

3.2.3.2. Individualização das Fêmeas Grávidas e/ou Ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas em hamsters ou codornas foram individualizadas em tubos de acrílico J-15 (35,5mm altura x 26,7mm diâmetro) contendo uma camada de gesso no fundo, para a manutenção da

umidade do microambiente, e um papel de filtro em seu interior, usado como suporte para o pouso da fêmea (Fig. 2). Estes tubos foram tampados com um pedaço de tecido de nylon preso por um tampa plástica contendo um furo em seu meio, no qual um chumaço de algodão embebido com solução de açúcar a 10% foi introduzido para servir como fonte energética. Cada tubo continha um rótulo com as seguintes informações: espécie, local e data da coleta, data da alimentação sanguínea e um código de coleta.

Figura 2. Tubo de acrílico para manutenção de fêmeas grávidas até obtenção das desovas.

3.2.3.3. Transferência dos Ovos

Após a oviposição, as fêmeas foram identificadas segundo GALATI (2003). Para a construção da tábua de vida, foram selecionadas as oviposições individuais com mais de 10 ovos. Estes foram transferidos com pincéis finos e umedecidos para placas de Petri plásticas contendo uma camada de gesso no fundo. Nas culturas em massa, ovos de fêmeas da mesma espécie foram agrupados para seu posterior seguimento. Os ovos foram colocados agrupados e o alimento foi adicionado um dia antes da eclosão das larvas, para evitar o crescimento excessivo de fungos.

3.2.3.4. Alimentação das Larvas

O alimento das formas larvais variou dependendo das características de cada espécie. As larvas de *Lu. longipalpis* foram alimentadas com fezes moídas de codorna, não esterilizadas. As formas imaturas de *Mg. migonei* foram alimentadas com uma mistura de fezes de codorna e fígado liofilizado. Para as larvas de *Pi. fischeri*, foram oferecidas várias misturas de alimento, no entanto, observou-se alimentação somente no fígado liofilizado, o que foi estabelecido como alimento padrão para esta espécie.

3.2.3.5. Seguimento das Formas Imaturas

O acompanhamento das formas imaturas foi realizado diariamente, sob microscópio estereoscópico. A observação diária foi necessária para retirada dos fungos que cresciam sobre o alimento, pois as larvas, principalmente em primeiro estádio, podiam ficar presas nas hifas dos fungos, impedindo-as de se locomoverem e de se alimentarem.

Após a eclosão, os adultos foram liberados em gaiolas e uma solução açucarada a 10% foi oferecida.

3.3. DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)

O ciclo gonotrófico foi considerado como o período compreendido entre alimentacao das fêmeas e a oviposição. Para estimar este parâmetro, as fêmeas alimentadas com sangue foram individualizadas em tubos de acrílicos, como descritos anteriormente, e mantidas a uma temperatura de 25°C (±1°C). Cada tubo foi rotulado com a data de alimentação sanguínea e a data de oviposição. Após a identificação das fêmeas, uma planilha para cada espécie foi construída com estas informações e estimou-se a mediana do número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição.

3.4. TAXA DE REPASTO SANGUÍNEO EM CÃO (AI) E INVESTIGAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL (b)

Para a investigação deste parâmetro empregou-se a seguinte metodologia:

Os flebotomíneos criados em laboratório foram transportados em frascos contendo gesso úmido no fundo para garantir o teor higrométrico, e lacrado. Estes frascos foram acondicionados em um isopor que também foi lacrado. Machos e fêmeas das três espécies: *Lu. longipalpis, Mg. migonei, Pi. fischeri* foram colocados simultaneamente na gaiola com o cão. Além dos espécimes criados em laboratório, também foram expostos para se alimentarem nos cães, espécimes de *Pi. fischeri* coletados em Embu e no Parque Estadual da Cantareira no dia anterior ao experimento.

Dois experimentos de xenodiagnóstico foram realizados no Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do município de Bauru. Os procedimentos envolvendo os cães (coleta de amostras de sangue e anestesia) foram realizados com colaboração do veterinário do CCZ.

No primeiro experimento, de cinco cães suspeitos de infecção por *L. i. chagasi,* dois tiveram a infecção confirmada mediante aplicação do teste Imunocromatográfico Rápido (TR-DPP) da BIO-MANGUINHOS.

No início do período noturno, machos e fêmeas de flebotomíneos foram liberados em uma gaiola de nylon (Fig.3) e uma primeira tentativa para ingurgitar as fêmeas foi realizada. Para isto, um cão foi anestesiado e exposto dentro da gaiola por uma hora, porém, nenhuma fêmea se ingurgitou. Para evitar uma segunda dose de anestesia neste cão, outra tentativa foi realizada com o segundo cão, que ficou exposto durante 1 hora. Decorrido este tempo, o cão foi retirado e a seguir, todos os insetos transferidos com aspirador de Castro para uma gaiola de nylon 20X30 cm. Esta foi colocada em caixa térmica de isopor com gesso umedecido. O

isopor foi coberto com um tecido de nylon fino e sobre este colocada a tampa, que foi vedada completamente com fita adesiva, para evitar qualquer fuga dos insetos.

Após a exposição do cão aos flebotomíneos, adicionalmente, amostras do baço e soro do animal foram coletadas para reconfirmarção da infecção do mesmo, por cultura de leishmânia e reação em cadeia da polimerase (PCR). O material coletado foi enviado ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo para a identificação do parasita (Anexo 1).

No segundo experimento, um cão foi exposto como acima descrito. Todavia, as fêmeas não se alimentaram quando deixadas livremente na gaiola. A seguir, os insetos foram capturados e mantidos em frascos de acrílico (35,5 hx, diâm, 26,7 mm), contendo até 5 fêmeas, os quais foram colocados em contato direto com a orelha do cão para as fêmeas se alimentarem. A exposição foi feita no interior da gaiola para este fim.

Ao término do experimento, imediatamente, os espécimes foram transportados até o LESP/Phlebotominae da FSP/USP e deixados em repouso por um período de 4 horas. Posteriormente, as fêmeas ingurgitadas foram individualizadas e identificadas morfologicamente, baseadas em caracteres externos. Uma vez identificadas, as fêmeas foram novamente liberadas em uma gaiola para cada espécie. Diariamente, as gaiolas foram revisadas, retirando as fêmeas mortas, que foram dissecadas para observação da infecção por *L. i. chagasi*.

Figura 3. Gaiola utilizada na realização dos experimentos de infecção experimental dos flebotomíneos em cão infectado por *L. infantum chagasi*.

3.5. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA ($\mathbf{e_{inf}}$)

Após a alimentação em no cão comprovadamente infectado pela *L. i. chagasi*, as fêmeas foram colocadas em gaiolas de nylon 20x30 cm, uma para cada espécie, que foram mantidas em local isolado, à temperatura ambiente (±25°C, UR ~80%). As gaiolas foram revisadas diariamente, no mesmo horário, registrando-se a mortalidade por contagem direta. Os dados foram digitalizados e uma matriz construída segundo os requerimentos do programa SPSS V17.0. A construção da tábua de vida foi realizada segundo CAREY (1993).

3.6. DISSECÇÃO DAS FÊMEAS E PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (**n**)

A dissecção das fêmeas foi realizada em solução salina sob um microscópio estereoscópico a aumento de 60x, expondo-se o intestino e genitália. Uma lamínula foi colocada sobre a amostra, que foi examinada sob microscópio óptico ao aumento de 400x para identificação da espécie do

flebotomíneo (por meio das espermatecas) e observação da infecção, pela presença de flagelados no tubo digestório. A dissecção das fêmeas foi feita na medida em que iam morrendo.

3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.7.1. Estimativa da Duração do Ciclo de Vida

Para o acompanhamento da coorte de imaturos e estimativa da duração do ciclo de vida de cada espécie, foram selecionadas oviposições com mais de 10 ovos, provenientes de fêmeas individualizadas. Para isto, os ovos produzidos por cada fêmea foram colocados em placas de gesso (cultura individual) e observados diariamente, contabilizando o número de mortes e a muda de cada estádio. Para cada estádio foram obtidas as seguintes informações:

- duração mínima: tempo mínimo em dias decorridos entre a observação do primeiro indivíduo do estádio até a observação do primeiro individuo no próximo estádio.

- duração máxima: tempo em dias decorrido entre a observação do primeiro indivíduo do estádio até a observação do último individuo neste estádio.

- duração mediana: para todos os estádios, foi considerada como o dia em que 50 por cento mais 1 (50%+1) dos indivíduos passaram para o estádio seguinte.

3.7.2. Análise da Mortalidade das Formas Imaturas

Embora a estimativa dos parâmetros expectativa de vida ao nascer e probabilidade de sobrevivência diária do vetor, usados no cálculo da capacidade vetorial, sejam obtidos de populações de adultos, considerou-se importante analisar a mortalidade durante o desenvolvimento das formas imaturas, pois desta dependerá a estabilidade da população de adultos presentes em determinada área.

Para isto, foram estimadas as seguintes informações em cada estádio de desenvolvimento (ovo, larva, pupa):

K_x = número de indivíduos vivos no começo do intervalo (estimado como o número de ovos, larvas e pupas no começo de cada estádio).

D_x = número de morte no intervalo (contabilizado diariamente durante a observação de cada cultura)

Mortalidade no intervalo; indicando a proporção de mortes ocorridas no estádio.

Mortalidade proporcional por estádio que mede a participação das mortes em cada estádio em relação ao total de mortes durante toda a fase imatura.

3.7.3. Expectativa de Vida Infectiva (**e_{inf}**)

Para estimar o tempo de vida infectivo das fêmeas foi construída a tábua de vida de uma geração de fêmeas após alimentação em cão infectado pela *L. i. chagasi*. A tábua de vida foi estruturada segundo CAREY (1993), onde:

X: classe de idade. Designa a idade exata quando começa o intervalo em relação ao início da coorte. A classe x inclui o intervalo compreendido entre idade x a idade x+1. Por exemplo, a classe zero (0) indica o período compreendido entre a alimentação da fêmea e o primeiro dia de vida após este evento.

K_x = número de indivíduos vivos no começo do intervalo.

D_x= número de mortes no intervalo. Diferente do observado em demografia, onde a raiz da tábua geralmente é 100.000, em biologia de populações geralmente este valor é 1, e os subseqüentes sobreviventes são expressados como fração do número original, denotado como P_x.

P_x : indica a fração da coorte original viva na idade x.

$m_x = P_{x+1}/P_x$; proporção de espécimes que sobrevivem no intervalo entre x a x+1, assim, por exemplo, $m_0 = P_1/P_0$.

q_x = Proporção dos sobreviventes na idade x que morreu no intervalo *x* a *x+1*. Calcula-se como $q_x = 1 - m_x$.

$d_x = P_x - P_{x+1}$; Proporção da coorte original P_0 que morreu no intervalo *x* a *x+1*. Representa a distribuição de freqüência das mortes na coorte. Por exemplo, $d_0 = P_0 - P_1$.

L_x = fração per capita do intervalo vivido no intervalo de idade x - x+1. Exemplo: $L_0 = P_0 - (1/2)d_1$.

T_x = indica o número de dias vividos desde a idade x. Este dado proporciona o número de insetos/dia vivido pela coorte desde a idade x, necessários para o cálculo da expectativa de vida.

Calcula-se segundo a função,

$$T_0 = \sum_{X=0}^{\omega} L_x = L_0 + L_1 + L_3 + \ldots\ldots\ldots\ldots L_n$$

e_x = expectativa de vida na idade x. Proporciona o tempo médio de vida restante para um indivíduo que sobreviveu ao começo do intervalo de idade indicado. Por exemplo, a expectativa de vida ao nascer de uma coorte será expressa como $e_0 = T_0/P_0$.

e_{inf} = vida infectiva, estimada como a expectativa de vida no período mediano de incubação extrínseca ou período mediano do ciclo gonotrófico.

3.7.4. Comparação das Curvas de Sobrevida

Um teste LogRank foi usado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida das três espécies sob investigação, utilizando-se o programa estatístico SPSS V17.0

3.7.5. Hábito de Picar o Cão (a)

Este dado foi calculado segundo a expressão a= AI/GC

Onde,

AI = proporção de fêmeas alimentadas no cão= número de fêmeas alimentadas no cão no total das liberadas na gaiola onde o cão foi

exposto.

GC = Duração do ciclo gonotrófico. O ciclo gonotrófico foi estimado pela mediana do período (em dias) que ocorreu a oviposição após a alimentação sanguínea das fêmeas no cão.

3.7.6. Taxa de Infecção Experimental

A taxa de infecção experimental de cada uma das espécies de flebotomíneos foi calculada pelo número de fêmeas com a presença de *L. i. chagasi* em relação ao total das fêmeas que se alimentaram no cão infectado por este parasita.

3.7.7. Proporção de Fêmeas com Formas Infectantes (**b**)

A proporção das fêmeas realmente infectantes foi estimada para cada espécie pelo número de fêmeas com formas metacíclicas no tubo digestório torácico, situadas posterior à válvula estomodeal, em relação ao total de fêmeas infectadas pela *L. i. chagasi*.

3.7.8. Duração do período de incubação extrínseca (**n**)

A estimativa deste parâmetro foi realizada pela dissecção diária de fêmeas da coorte alimentada em cão comprovadamente infectado *pela L. (L.) infantum chagasi*. Para isto, as fêmeas que morriam diariamente foram dissecadas para observar a presença de formas da leishmânia e sua localização no tubo digestório. O valor deste parâmetro foi estimado como o dia mediano em que as formas promastigotas metacíclicas surgiram, considerando-se que se esperou a morte das fêmeas para realizar a dissecção. Quando não observadas, o valor adotado foi o da duração do ciclo gonotrófico, assumindo concordância entre o surgimento das formas infectivas e a oviposição.

3.7.9. Capacidade Vetorial

Uma vez calculados os parâmetros anteriores, a capacidade vetorial foi estimada adaptando-se a equação da capacidade vetorial (REINSEN, 1989), segundo a fórmula:

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

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

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

a = estimado como AI/GC, sendo AI a proporção de fêmeas que se alimentaram no cão infectado pela *L. i. chagasi* e GC a duração do ciclo gonotrófico.

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

n = período de incubação extrínseca, sendo o tempo mediano desde a alimentação no cão infectado até o surgimento das formas infectantes. Estimado também pela duração mediana do ciclo gonotrófico, assumindo-se concordância entre o tempo de desenvolvimento das formas metaciclícas e o da oviposição.

e_{inf} = expectativa de vida infectiva da população de fêmeas após se tornarem infectantes, ou a mediana do tempo (dias) em que se completou o ciclo gonotrófico.

3.8. CONDIÇÕES PARA A MANUTENÇÃO DOS INSETOS, ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Os insetos foram mantidos do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae (FSP/USP). As paredes, portas e janelas do insetário são vedadas e, além disso, na porta de entrada existe uma cortina de vento para evitar a fuga de insetos.

Após a alimentação, os insetos foram mantidos em gaiolas em uma área de isolamento. Os hamsters foram mantidos em local separado à temperatura ambiente. Estes dois compartimentos fazem parte do insetário e contam com as respectivas medidas de segurança.

3.9. ASPECTOS DA ÉTICA ANIMAL

A alimentação foi feita em pelo menos dois cães comprovadamente infectados pela *L. i. chagasi*, em duas oportunidades. Após os cães terem sido expostos às fêmeas de flebotomíneo, foram eutanasiados, conforme recomendação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (MS, 2006). Os cães foram manipulados por servidores treinados do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, e anestesiados antes de serem expostos aos flebotomíneos.

Nos experimentos para a transmissão da *L. i. chagasi*, foram utilizados 3 hamsters, um para cada espécie de flebotomíneos estudados. A exposição aos flebotomíneos supostamente infectados foi por período de uma hora. Os hamsters foram anestesiados, colocados em uma gaiola adequada enquanto expostos. Após isto, foram transferidos para caixas apropriadas com alimento e água *ad libidum*.

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

3.10. QUESTÕES DE BIOSSEGURANÇA

Conforme relatado, o insetário do laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae apresenta vedação para impedir a saída de flebotomíneos. O pessoal que manipulou os insetos esteve devidamente protegido.

Os insetos transportados para a realização do xenodiagnóstico em cães infectados foram mantidos em gaiolas, devidamente fechadas e dentro de isopor lacrado, de modo a garantir que nenhum inseto escapasse. Os hamsters submetidos a picadas de insetos, infectados ou não, foram mantidos em segurança, isolados dos insetos. Quando sacrificados, ou mortos naturalmente, o descarte foi feito segundo as normas de segurança da FSP da USP.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Biossegurança da FSP/USP, na segunda reunião ordinária, em 10 de dezembro de 2009 (Anexo 4).

4. RESULTADOS

4.1. DENSIDADE DOS FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AOS CÃES (M)

Durante as seis coletas realizadas em canil, no município de Embu, foram coletados 148 espécimes representando cinco espécies. *Pintomyia fischeri* predominou, com 95,3% do total de insetos coletados (Tabela 1). No município de Campo Grande (MS), em uma única coleta realizada em canil, apenas *Lutzomyia longipalpis* foi capturada.

Tabela 1. Número de flebotomíneos, segundo, local de coleta, espécie, sexo e horas de coleta, capturados em canil ou pousados nos cães.

Local	Embu			Campo Grande			Dias de coleta	Número de cães	Valor m
Espécie	♀	♂	Total	♀	♂	Total			
Pintomyia fischeri	132	9	141	-	-	-	6	4	5,5
Migonemyia migonei	1	1	2	-	-	-	6	4	0,04
Evandromyia edwardsi	1	2	3	-	-	-	6	4	0,04
Pintomyia monticola	2	-	2				6	4	0,08
Lutzomyia longipalpis	-	-	-	7	26	33	1	2	3,5
Total	136	12	148	7	26	33	7		

Dessa forma, para cada espécie, a estimativa da densidade de fêmeas por cão por dia foi: *Pi. fischeri* (5,5), *Mg. migonei* (0,04) e *Lu. longipalpis* (3,5) .

4.2. CAPTURA DE ESPÉCIMES SILVESTRES PARA OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O número de horas de exposição das armadilhas e os insetos capturados, segundo as localidades, constam da Tabela 2.

As coletas realizadas em Cotia e Embu mostraram uma baixa densidade de *Pi. fischeri* (média de 37,3 e 22,4 fêmeas por coleta, respectivamente), dificultando a obtenção de culturas desta espécie para as experiências de criação em condições de laboratório. Apesar disso, foi possível isolar algumas culturas que permitiram realizar observações preliminares do desenvolvimento das formas imaturas desta espécie.

Nas coletas realizadas com armadilha de Shannon no Parque Estadual da Cantareira (SP), foram capturadas fêmeas de *Pi. fischeri,* obtendo-se as culturas para a construção da tábua de vida. Entretanto, o rendimento das culturas foi baixo, principalmente pela alta mortalidade observada nas primeiras fases do ciclo de vida.

Na região de Embu e Cotia, 11 espécimes de *Mg. migonei* foram capturados, o que não permitiu obter culturas provenientes da área. No entanto, na zona rural do município de Mogi Guaçu foram coletadas fêmeas ingurgitadas desta espécie, utilizadas para observação do desenvolvimento da espécie e a construção da tábua de vida.

No município de Bauru, em ambiente peri-urbano, para *Lu. longipalpis* uma média horária inferior 0,10 fêmeas foi obtida. No município de Bonito, MS, de 4 fêmeas obtidas não foram obtidas culturas. Para obtenção da F1 e subsequentes desta espécie foram coletadas 125 fêmeas na cidade de Campo Grande (MS) e também provenientes de uma colônia que se encontrava na 38ª geração, cujos espécimes iniciadores são de Barcarena, PA.

Tabela 2. Tempo de coleta, localidades e freqüência das espécies objetos do presente estudo: *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* .

Localidade	Tempo de Armadilhas expostas (horas)	Espécie	Fêmeas	Machos	Subtotal	Total/ locali-dade	%
Bauru (SP)	A A L (108) A Sh (08)	*Lu. longipalpis*	2	14	16	16	100
Cotia (SP)	A A L (389) A Sh 48	*Mg. migonei*	3	4	7	385	1,8
		Pi. fischeri	269	109	378		98,2
Embu (SP)		*Mg. migonei*	2	2	4		1,1
		Pi. fischeri	261	89	350		97,8
Parque Estadual da Cantareira (SP)	A Sh (12)	*Mg. migonei*	10	5	15	246	6,1
		Pi. fischeri	158	73	231		93,9
Mogi Guaçu (SP)	A A L (70)	*Mg. migonei*	116	41	157	177	88,7
		Pi. fischeri	15	5	20		11,3
Bonito (MS)	A A L (24)	*Lu. longipalpis*	4	47	51	51	100
Campo Grande (MS)	A A L (24)	*Lu. longipalpis*	125	26	151	151	100
Total			965	415	1380		

A A L = armadilhas automática luminosa; A Sh = armadilha de Shannon;
Lu. = *Lutzomyia*; *Mg*. = *Migonemyia*;; *Pi*. = *Pintomyia*;

4.3. OBSERVAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS ESTUDADAS E CONSTRUÇÃO DA TÁBUA DE VIDA

4.3.1. *Migonemyia Migonei*

4.3.1.1. Início da Cultura

Foram obtidas 25 culturas individuais (uma cultura por fêmea) e oito culturas em massa (ovos de várias fêmeas). As culturas isoladas forneceram 536 ovos, que foram utilizadas no seguimento diário das fases imaturas desta espécie para análise da mortalidade. Os tempos mediano, mínimo e máximo do desenvolvimento dos imaturos desta espécie são apresentados na Tabela 3, e as formas imaturas ilustradas na Figura 4.

Tabela 3. Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Migonemyia migonei* em condições de laboratório à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%.

Estádio	N	Mediana (dias)	Mínima (dias)	Máxima (dias)
Ovo	536	10	8	11
Larva 1	340	6,5	6	8
Larva 2	334	5	4	6
Larva 3	334	5,5	4	8
Larva 4	329	10,1	9	11
Pupa	329	10	10	11
Total da fase imatura		47,5	41	55

4.3.1.2. Análise da Mortalidade das fases imaturas de *Mg. Migonei*

Durante o desenvolvimento dos imaturos de *Mg. migonei* observou-se uma mortalidade acumulada de 39,3%. A maior mortalidade ocorreu na fase de ovo, representando 94,6 % do total das mortes dos imaturos (Tabela 4). Durante a fase larval observou-se uma pequena proporção de mortes

relacionadas, principalmente, ao crescimento de fungos, impedindo o movimento e alimentação das larvas que ficavam presas nas hifas.

Tabela 4. Análise de mortalidade de uma geração de uma coorte de imaturos de *Mg. migonei*.

Estádio do desenvolvimento	Número de indivíduos vivos no começo do intervalo K_X	Número de mortes no intervalo D_X	Mortalidade no intervalo (%)	Proporção de mortes no intervalo (%)
Ovo	536	196	36,57	94,68
Larva 1	340	6	1,76	2,90
Larva 2	334	0	0,00	0,00
Larva 3	334	5	1,50	2,42
Larva 4	329	0	0,00	0,00
Pupa	329	0	0,00	0,00
Total		207	39,83	100

4.3.1.3. Sobrevida das fêmeas de *Mg. migonei* ingurgitadas em cão comprovadamente infectado pela *L. i. chagasi*

Os dados para a construção da tábua de vida desta espécie são apresentados na Tabela 5.

A expectativa de vida das fêmeas de *Mg. migonei* ao início da observação da coorte foi 6,61 dias. A sobrevida após o repasto sanguíneo se manteve acima de 50% até o sexto dia (Tabela 6). No período compreendido entre o sétimo e o nono dia, observou-se uma queda na curva da sobrevida (Fig.5), acumulando uma mortalidade de 91% ao final do intervalo. Esta alta taxa de mortalidade coincidiu com a duração do ciclo gonotrófico desta espécie, indicando uma grande influência da oviposição na mortalidade das fêmeas. No entanto, 9% das fêmeas conseguiram sobreviver pelo menos um dia após a oviposição e 2%, até o 12° dia (Tabela 6). A mediana da sobrevivência observada após o repasto infectante foi de 7,8 dias (Fig. 5).

Tabela 5. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), *x*	intervalo de idade (dias), *x* a *x+1*	Numero de Sobreviventes no começo do intervalo, K_x	Numero de mortes no intervalo de idade, D_x
0	0-1	44	1
1	1-2	43	1
2	2-3	42	1
3	3-4	41	4
4	4-5	37	4
5	5-6	33	8
6	6-7	25	4
7	7-8	21	1
8	8-9	20	16
9	9-10	4	2
10	10-11	2	1
11	11-12	1	1
12	12-13	0	0

Tabela 6. Tábua de vida de uma geração de uma coorte de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), x	Proporção de sobreviventes na idade *x*, P_x	Proporção de sobreviventes da idade *x* a *x+1*, m_x	Proporção dos sobreviventes na idade x que morreu de *x* a *x+1*, q_x	Proporção da coorte original P_0 que morreu no intervalo *x* a *x+1*, d_x	Dias vividos no intervalo, L_x	Dias vividos desde a idade x, T_x	Expectativa de vida, e_x
0	1,00	0.98	0.02	0.02	0.99	6.61	6.61
1	0,98	0,98	0,02	0,02	0,97	5,63	5,76
2	0,95	0,98	0,02	0,02	0,94	4,66	4,88
3	0,93	0,90	0,10	0,09	0,89	3,72	3,99
4	0,84	0,89	0,11	0,09	0,80	2,83	3,36
5	0,75	0,76	0,24	0,18	0,66	2,03	2,71
6	0,57	0,84	0,16	0,09	0,52	1,38	**2,42***
7	0,48	0,95	0,05	0,02	0,47	0,85	1,79
8	0,45	0,20	0,80	0,36	0,27	0,39	0,85
9	0,09	0,50	0,50	0,05	0,07	0,11	1,25
10	0,05	0,50	0,50	0,02	0,03	0,05	1,00
11	0,02	0,00	1,00	0,02	0,01	0,01	0,50
12	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	-

* Valor e_{inf} adotado na estimativa da capacidade vetorial, considerando-se incubação extrínseca n=6 - 7 dias

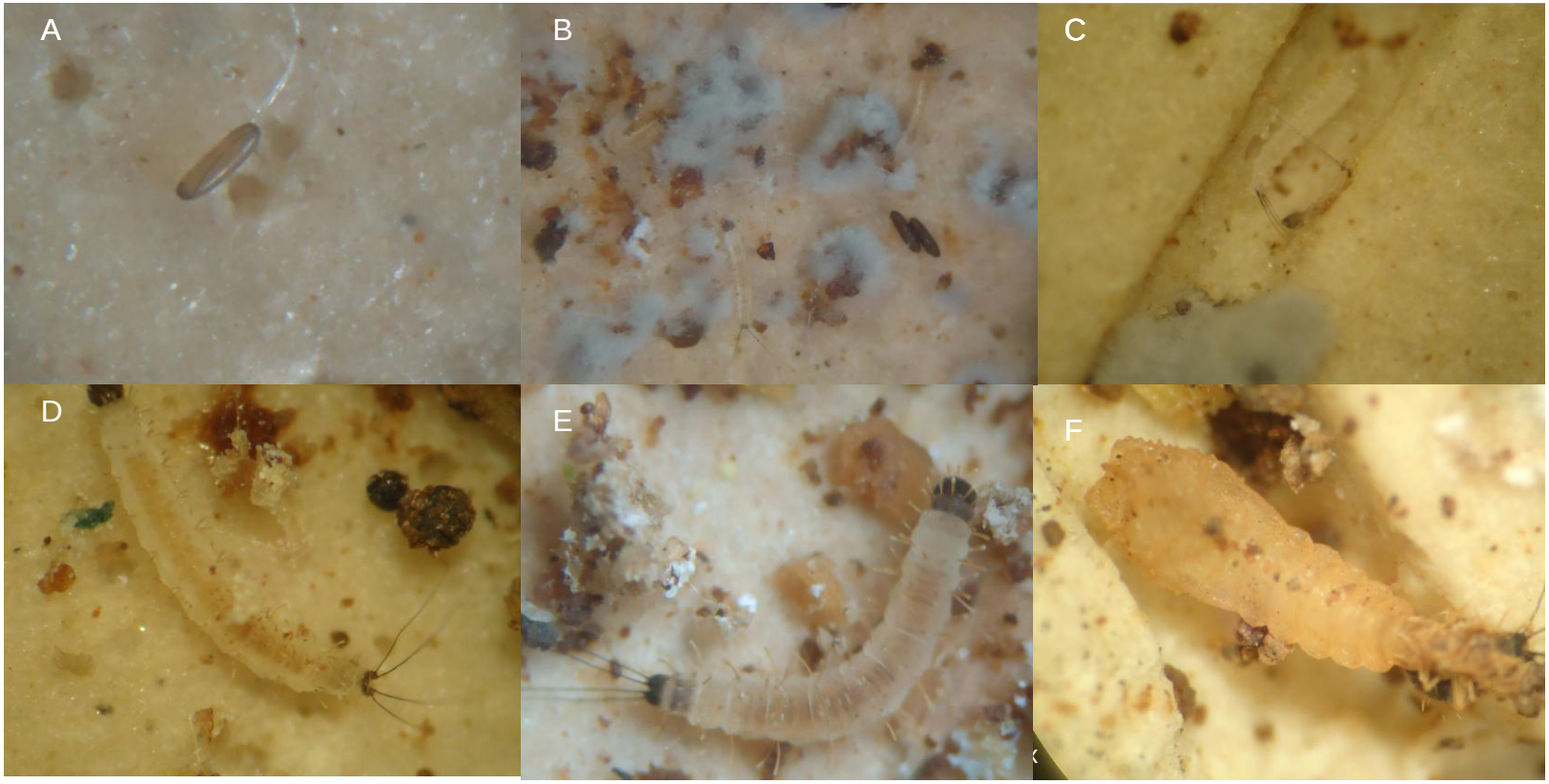

Figura 4. Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Mg. Migonei*. (60x). A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 33. E. Larva 4. F. Pupa.

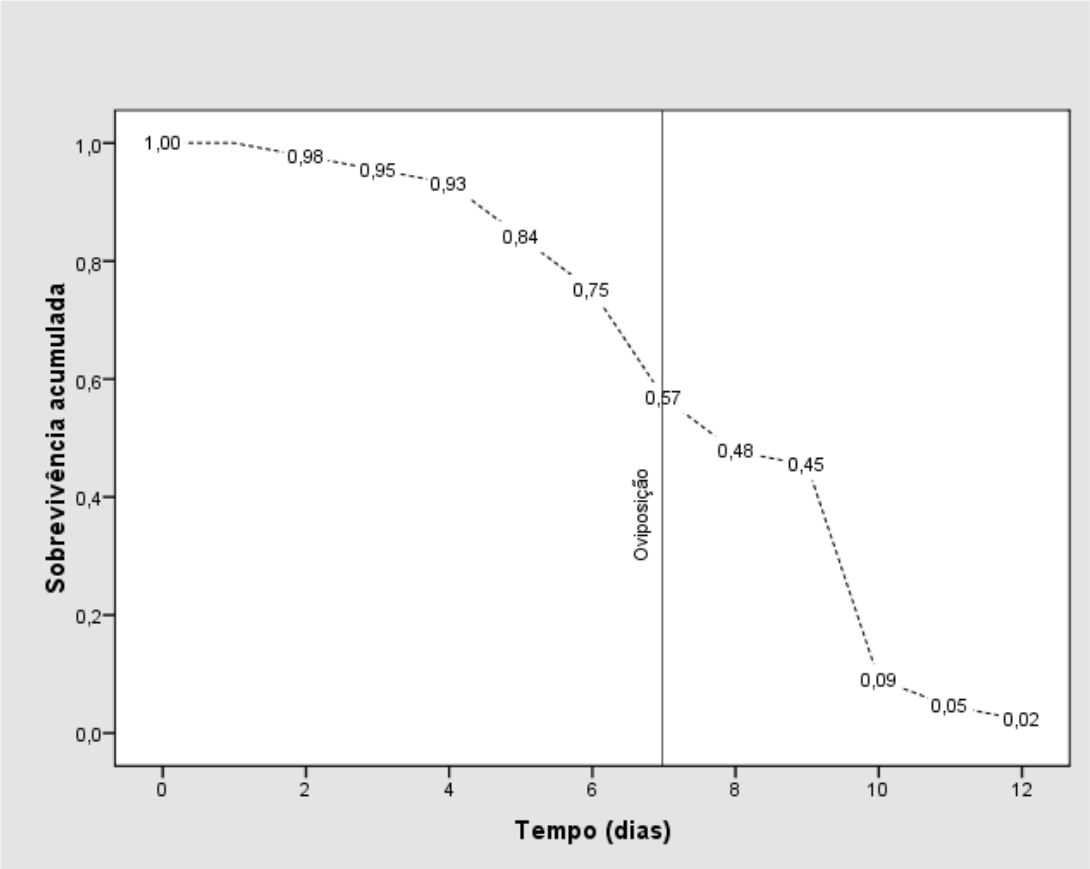

Figura 5. Sobrevivência de fêmeas de *Migonemyia migonei* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

4.3.2. *Pintomyia fischeri*

4.3.2.1. Início da Cultura

Foram obtidas 21 culturas individuais que forneceram 580 ovos utilizados no seguimento diário das fases imaturas desta espécie. Os tempos mediano, mínimo e máximo do desenvolvimento dos imaturos desta espécie são apresentados na Tabela 7, e as formas imaturas ilustradas na Figura 6.

Tabela 7. Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Pintomyia fischeri* em condições de laboratório à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%.

Estádio do desenvolvimento	Tamanho da amostra	Mediana (dias)	Mínima (dias)	Máxima (dias)
Ovo	580	8,5	8	11
Larva 1	281	8,0	7	8
Larva 2	233	5,0	4	6
Larva 3	229	8,5	6	10
Larva 4	224	14,0	12	18
Pupa	212	14,0	11	15
Total da fase imatura		58	48	68

4.3.2.2. Análise da Mortalidade da fase imatura de *Pi. fischeri*

A mortalidade estimada das formas imaturas foi construída com culturas que completaram o ciclo de vida até adulto. Para observação da sobrevivência dos imaturos, partiu-se de 580 ovos obtidos em 22 culturas individuais. Esta espécie apresentou grandes dificuldades para seu desenvolvimento em condições de laboratório, principalmente nas fases de ovo em que a taxa de mortalidade alcançou 51,5% (Tabela 8).

O primeiro estádio (L1) apresentou a segunda maior mortalidade (8,3%), ocorrendo geralmente durante os dois primeiros dias após a eclosão. Assim, pode-se observar que 94% do total das mortes dos imaturos ocorreram nas primeiras fases do ciclo imaturo.

Para esta espécie, a mortalidade durante a ecdise foi observada em todos os estádios. O rendimento das culturas foi pequeno, mesmo quando a cultura foi iniciada com um grande número de ovos.

Tabela 8. Análise de mortalidade de uma geração de uma coorte de imaturos de *Pintomyia fischeri*.

Estádio do desenvolvimento	Número de sobreviventes no começo do intervalo	Número de mortes no intervalo	Mortalidade no intervalo (%)	Proporção das mortes
	K_X	D_X		
Ovo	580	299	51,55	81,03
Larva 1	281	48	17,08	13,01
Larva 2	233	4	1,72	1,08
Larva 3	229	5	2,18	1,36
Larva 4	224	12	5,36	3,25
Pupa	212	1	0,47	0,27
Total		369	78,36	100

4.3.2.3. Sobrevida das fêmeas de *Pi. fischeri* ingurgitadas em cão comprovadamente infectado pela *Leishmania infantum chagasi*

Os dados para a construção da tábua de vida desta espécie são apresentados na tabela 9.

A mediana da sobrevivência observada após o repasto infectante foi de 5,0 dias.

Esta espécie apresentou características particulares em relação à mortalidade das fêmeas ingurgitadas. Diferente do observado nas fêmeas de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, as fêmeas ingurgitadas de *Pi. fischeri* apresentaram um tempo de sobrevivência menor (Tabela 10)

Ainda que durante os quatro primeiros dias após o repasto sanguíneo a sobrevivência foi de 94%, um declínio acentuado na sobrevivência acumulada aconteceu durante o período pós-oviposição (Fig. 7), indicando o efeito traumático deste evento na sobrevida das fêmeas em condições experimentais. Todavia, até o final do sétimo dia, ainda se observou uma sobrevivência de 10%, indicando que uma parte das fêmeas sobreviveu pelo menos 1 dia após a oviposição.

Tabela 9. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Pintomyia fischeri* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), *x*	Intervalo de idade (dias), *x* a *x+1*	Sobrevivente no começo do intervalo, K_x	Numero de morte no intervslo de idade, D_x
0	0-1	78	2
1	1-2	76	0
2	2-3	76	2
3	3-4	74	9
4	4-5	65	32
5	5-6	33	25
6	6-7	8	8
7	7-8	0	0

Tabela 10. Tábua de vida de fêmeas de *Pi. fischeri,* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), x	Proporção de sobreviventes na idade *x*, P_x	Proporção de sobreviventes da idade *x* a *x+1*, m_x	Proporção dos sobreviventes na idade x que morreu de *x* a *x+1*, q_x	Proporção da coorte original P_0 que morreu no intervalo *x* a *x+1*, d_x	Dias vividos no intervalo, L_x	Dias vividos desde a idade x, T_x	Expectativa de vida, e_x
0	1,00	0,97	0,03	0,06	2,33	11,24	4,76
1	0,97	1,00	0,00	0,00	2,30	8,91	3,87
2	0,97	0,97	0,03	0,06	2,27	6,61	2,87
3	0,95	0,88	0,12	0,27	2,11	4,33	1,93
4	0,83	0,51	0,49	0,97	1,48	2,23	1,13
5	0,42	0,24	0,76	0,76	0,62	0,74	**0,74***
6	0,10	0,00	1,00	0,24	0,12	0,12	0,50
7	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	-

* Valor e_{inf} adotado na estimativa da capacidade vetorial, considerando-se incubação extrínseca n=5 - 6 dias

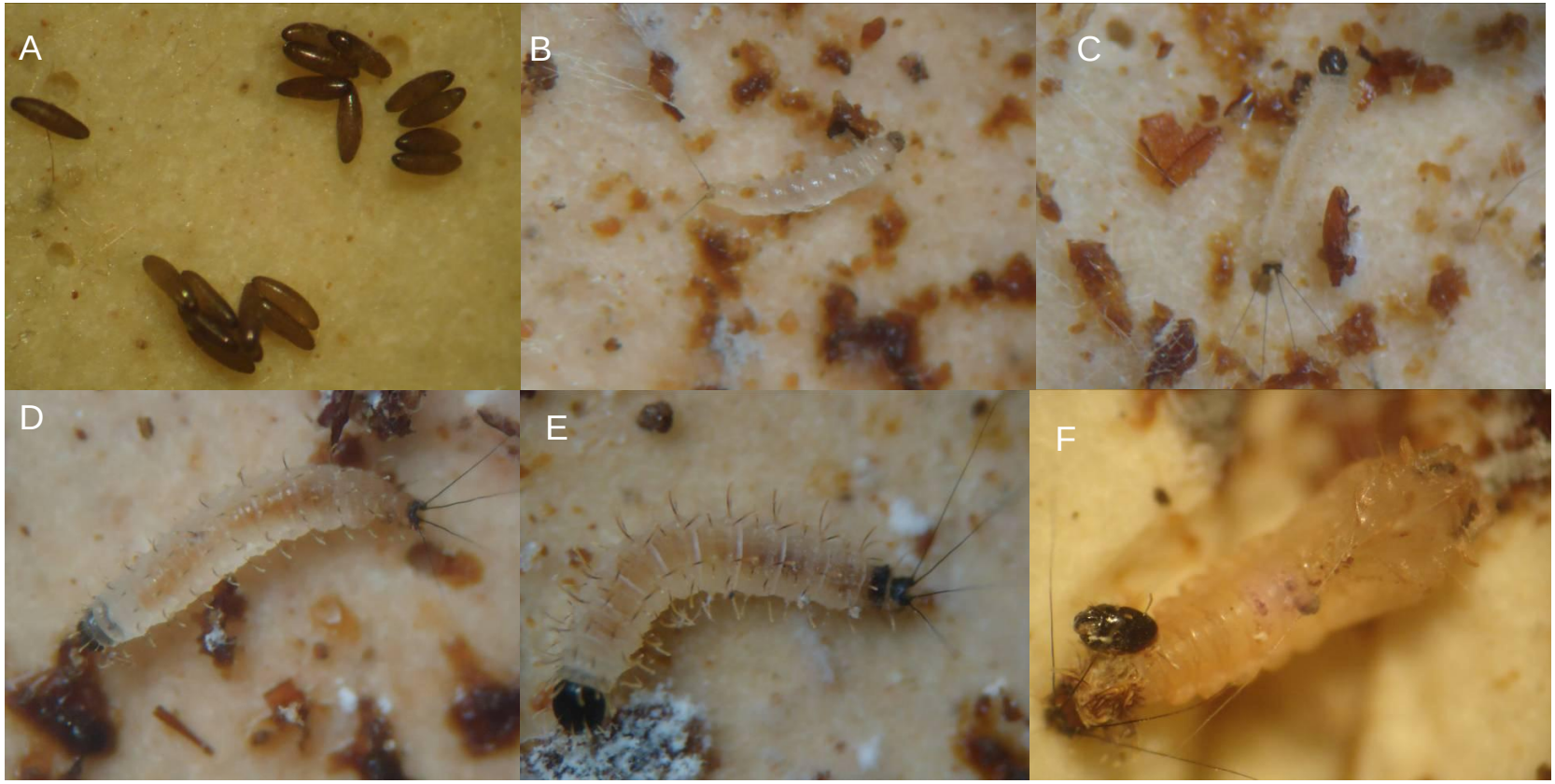

Figura 6. Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Pi. fischeri*. (60x).A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 3. E. Larva 4. F. Pupa.

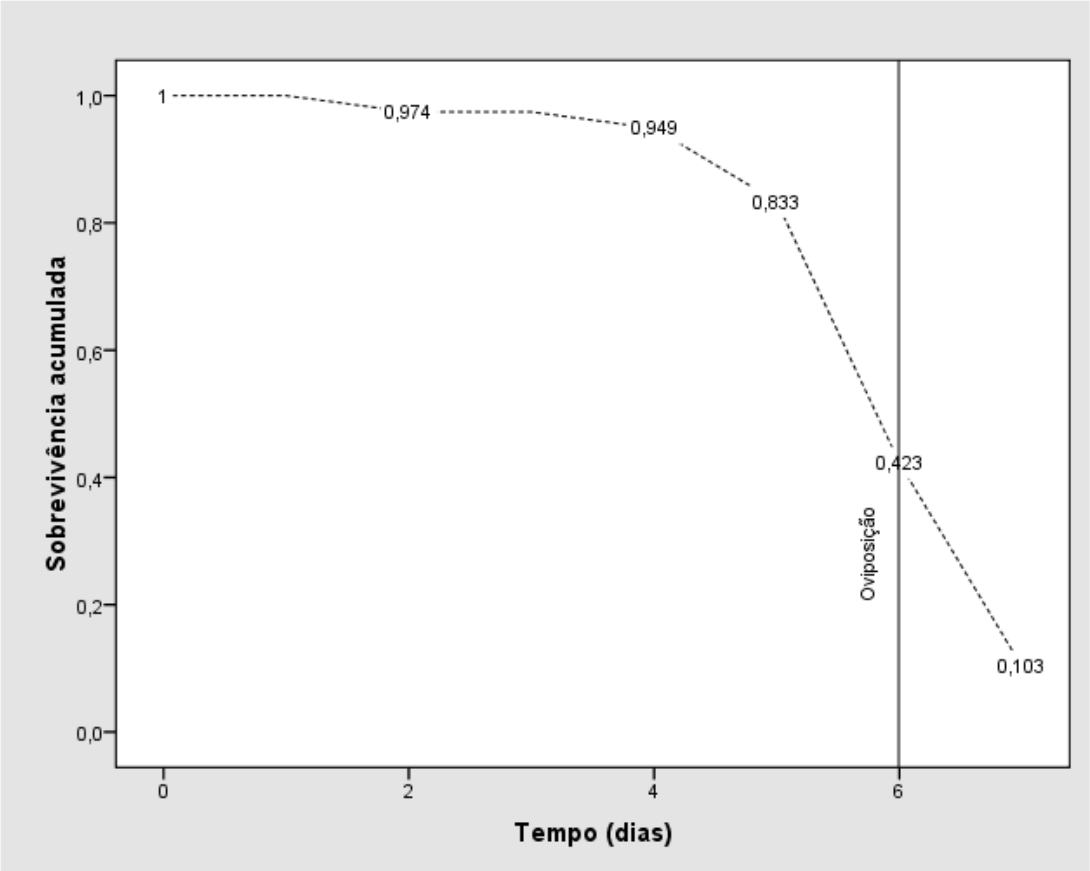

Figura 7. Sobrevivência de fêmeas de *Pintomyia fischeri* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi..*

4.3.3. *Lutzomyia longipalpis*

4.3.3.1. Início da Cultura

Esta espécie desenvolveu-se bem em condições experimentais, apresentou uma baixa mortalidade nos estádios larvais e mostrou uma ampla adaptação a diferentes tipos de alimento. Os tempos mediano, mínimo e máximo do desenvolvimento das formas imaturas são apresentados na Tabela 11, e as formas imaturas ilustradas na Figura 8.

Tabela 11: Duração do período (dias) de desenvolvimento do ovo, estádios larvais, pupa e total da fase imatura de *Lutzomyia longipalpis* em condições de laboratório, à temperatura de 25°C (±1°C), UR ~80%.

Estádio	N	Mediana (dias)	Mínima (dias)	Máxima (dias)
Ovo	449	10,0	8	15
Larva 1	224	6,5	6	7
Larva 2	223	6,5	6	10
Larva 3	223	7,5	6	8
Larva 4	220	8,0	7	10
Pupa	218	8,0	8	9
Total da fase imatura		46,5	41	59

4.3.3.2. Análise da Mortalidade na fase imatura de *Lu. longipalpis*

Das amostras obtidas de fêmeas silvestres, a maior perda de imaturos ocorreu na fase de ovo, com uma taxa de não eclosão de 49,7% (Tabela 12). Esta alta taxa pode ter sido decorrente do stress causado pela falta de umidade que os ovos foram expostos durante o transporte, bem como pela não fecundação. As perdas durante a fase de ovo representaram 96,5% do total das observadas durante o desenvolvimento da fase imatura, mostrando que após a eclosão, as larvas apresentam uma boa adaptação e facilidade de colonização.

Tabela 12. Tábua de vida temporal de uma geração de uma coorte de imaturos de *Lutzomyia longipalpis* a partir de ovos de fêmeas selvagens de Campo Grande, MS.

Estádio do desenvolvimento	Número de vivos no começo do intervalo K_X	Número de mortes no intervalo D_X	Mortalidade no intervalo (%)	Proporção das mortes
Ovo	449	223	49,67	96,54
Larva 1	226	3	1,33	1,30
Larva 2	223	0	0,00	0,00
Larva 3	223	3	1,35	1,30
Larva 4	220	2	0,91	0,87
Pupa	218	0	0,00	0,00
Total		231	51,45	100,00

Quando a cultura iniciou a partir de ovos de fêmeas colonizadas em laboratório, houve melhor rendimento, dado que a quantidade de perdas nesta fase foi de 32,7% (Tabela 13). Este fato pode estar relacionado principalmente à adaptação da população desta espécie, procedentes de Barcarena (PA), às condições experimentais.

Além disso, a proporção da mortalidade no estágio de ovo em relação ao total das mortes durante a fase imatura foi também bastante elevada (89,33%) comparada à da proveniente de fêmeas silvestres (96,54%), indicando que uma parte das oviposições pelas fêmeas, tanto silvestres quanto de colônias, poderiam ser inférteis.

Tabela 13. Tábua de vida temporal de uma geração de uma coorte de imaturos de *Lutzomyia longipalpis* a partir de ovos de fêmeas da colônia do Instituto Evandro Chagas, procedentes de Barcarena, PA.

Estádio do desenvolvimento	Número de vivos no começo do intervalo K_X	Número de mortes no intervalo D_X	Mortalidade no intervalo (%)	Proporção das mortes
Ovo	205	67	32,68	89,33
Larva 1	138	6	4,35	8,00
Larva 2	132	2	1,52	2,67
Larva 3	130	0	0,00	0,00
Larva 4	220	0	0,00	0,00
Pupa	218	0	0,00	0,00
Total		75	38,55	100,00

Em geral, estes resultados da sobrevivência de imaturos mostram que a obtenção da primeira geração dos flebotomíneos em condições de laboratório é fundamental para a posterior colonização destes insetos, dada à dificuldade de adaptação dos mesmos e de se reproduzir em laboratório determinadas condições próprias do ambiente natural de desenvolvimento.

4.3.3.3. Sobrevivência na Fase Adulta de Fêmeas de *Lu. longipalpis*

Os dados para a construção da tábua de vida desta espécie são apresentados na tabela 14.

A sobrevivência mediana das fêmeas de *Lu. longipalpis* após o repasto sanguíneo foi de 8,0 dias. No começo da observação da coorte, as fêmeas apresentam uma expectativa de vida de 7,5 dias. Durante os sete primeiros dias, a sobrevivência foi superior a 80% (Fig. 9), apresentando taxas de mortalidade que variaram entre 0 e 7%. Entre o oitavo e o décimo dia, houve uma queda abrupta da sobrevivência acumulada, diminuindo de 49% para 7%. No final da coorte observou-se que 3% das fêmeas conseguiram sobreviver até o 15º dia após repasto sanguíneo (Tabela 15).

Tabela 14. Construção da tábua de vida para uma geração da uma coorte de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), *x*	intervalo de idade (dias), *x* a *x+1*	Sobrevivente no começo do intervalo, K_x	Numero de morte no intervslo de idade, D_x
0	0-1	35	2
1	1-2	33	0
2	2-3	33	1
3	3-4	32	0
4	4-5	32	2
5	5-6	30	1
6	6-7	29	2
7	7-8	27	10
8	8-9	17	14
9	9-10	3	1
10	10-11	2	0
11	11-12	2	0
12	12-13	2	0
13	13-14	2	1
14	14-15	1	1
15	15-16	1	0
16	16-17	0	0

Tabela 15: Tábua de vida de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

Classe de idade (dias), x	Proporção de sobreviventes na idade *x*, P_x	Proporção de sobreviventes da idade *x* a *x+1*, m_x	Proporção dos sobreviventes na idade x que morreu de *x* a *x+1*, q_x	Proporção da coorte original P_0 que morreu no intervalo *x* a *x+1*, d_x	Dias vividos no intervalo, L_x	Dias vividos desde a idade x, T_x	Expectativa de vida, e_x
0	1,00	0,94	0,06	0,06	0,97	7,53	7,53
1	0,94	1,00	0,00	0,00	0,94	6,56	6,95
2	0,94	0,97	0,03	0,03	0,93	5,61	5,95
3	0,91	1,00	0,00	0,00	0,91	4,69	5,13
4	0,91	0,94	0,06	0,06	0,89	3,77	**4,13***
5	0,86	0,97	0,03	0,03	0,84	2,89	3,37
6	0,83	0,93	0,07	0,06	0,80	2,04	2,47
7	0,77	0,63	0,37	0,29	0,63	1,24	1,61
8	0,49	0,18	0,82	0,40	0,29	0,61	1,26
9	0,09	0,67	0,33	0,03	0,07	0,33	3,83
10	0,06	1,00	0,00	0,00	0,06	0,26	4,50
11	0,06	1,00	0,00	0,00	0,06	0,20	3,50
12	0,06	1,00	0,00	0,00	0,06	0,14	2,50
13	0,06	0,50	0,50	0,03	0,04	0,09	1,50
14	0,03	1,00	0,00	0,00	0,03	0,04	1,50
15	0,03	0,00	1,00	0,03	0,01	0,01	0,50
16	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	-

* Valor e_{inf} adotado na estimativa da capacidade vetorial, considerando-se incubação extrínseca n=4 - 5 dias

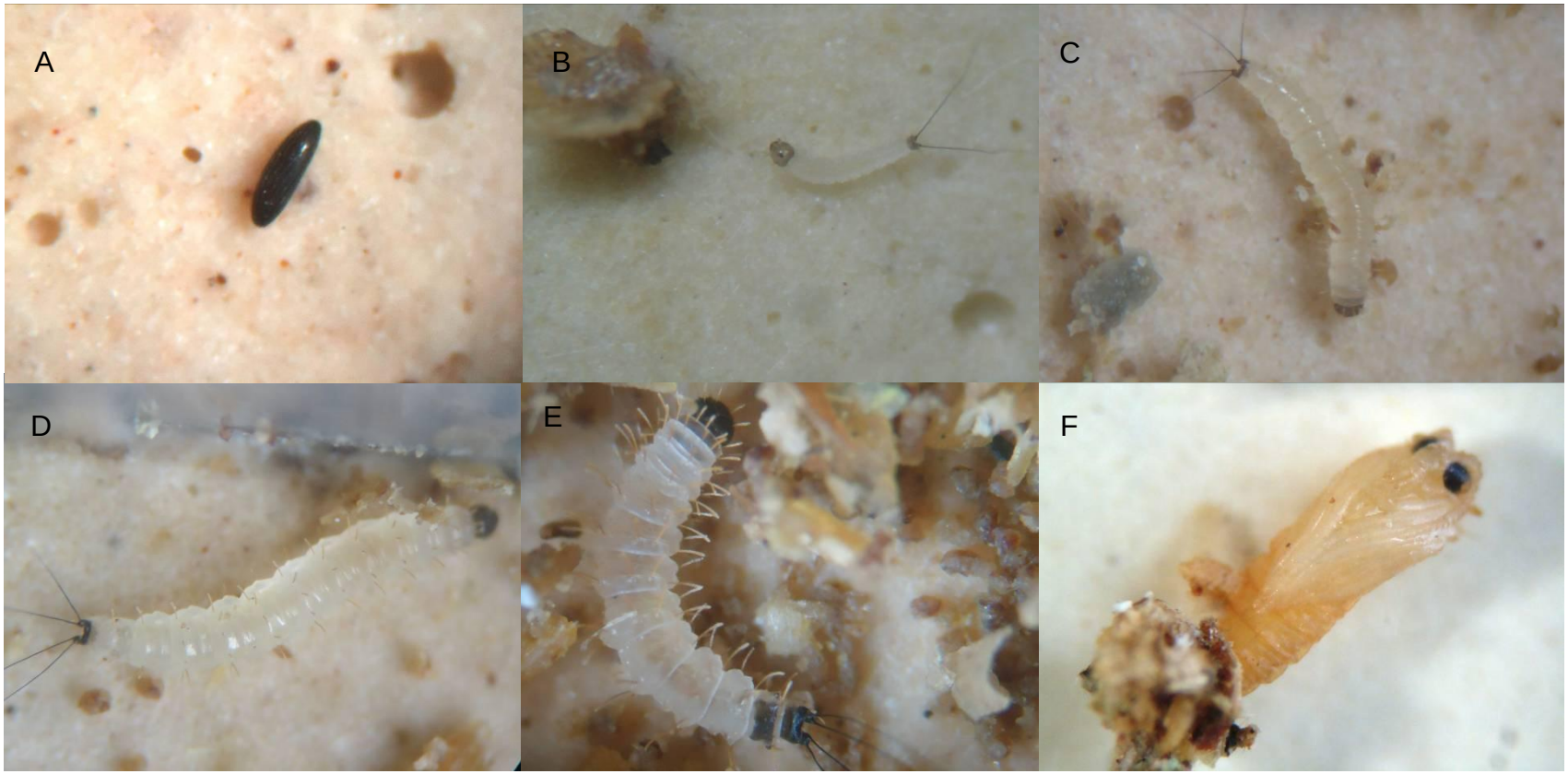

Figura 8: Microfotografias ilustrativas das formas imaturas de *Lu. longipalpis*. (60x).A. ovo. B. Larva 1. C Larva 2. D. Larva 3. E. Larva 4. F. Pupa.

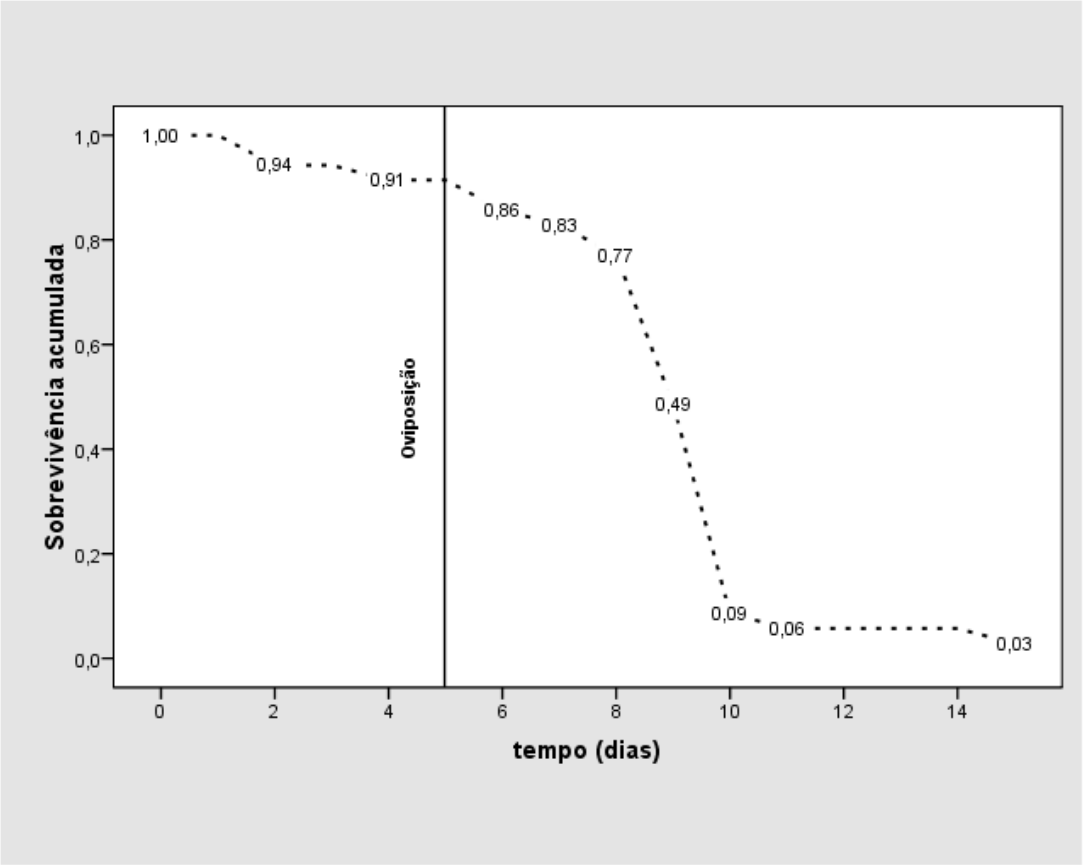

Figura 9. Sobrevivência de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo em cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.*

4.4. COMPARAÇÃO DA SOBREVIDA DAS ESPÉCIES SOB INVESTIGAÇÃO

4.4.1. Formas imaturas

A duração resumida do ciclo de vida imaturo das espécies sob investigação é apresentada na tabela 16. O ciclo de vida de *Pi. fischeri* foi maior que o de *Lu. longipalpis* e de *Mg. migonei,* que apresentaram valores próximos.

Tabela 16. Duração da fase imatura em condições de laboratório de *Lu. longipalpis, Mg. migonei* e *Pi. fischeri,* 25ºC (±1ºC), ~ 80% UR.

Espécie	n	Mínima (dias)	Máxima (dias)	Mediana (dias)
Lu. longipalpis	449	41	59	46,5
Mg. migonei	536	41	55	47,5
Pi. fischeri	580	48	68	58

4.4.2. Adultos - Fêmeas

A comparação das curvas de sobrevida mediante o teste Log Rank mostrou diferenças estatisticamente significantes entre a sobrevida de *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* (p<0.00) e, de *Pi. fischeri* e *Lu. longipalpis* (p<0.00). As curvas de sobrevida de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (p>0,05). Os valores são apresentados na Tabela 17 e o gráfico comparativo das curvas de sobrevida na Figura10.

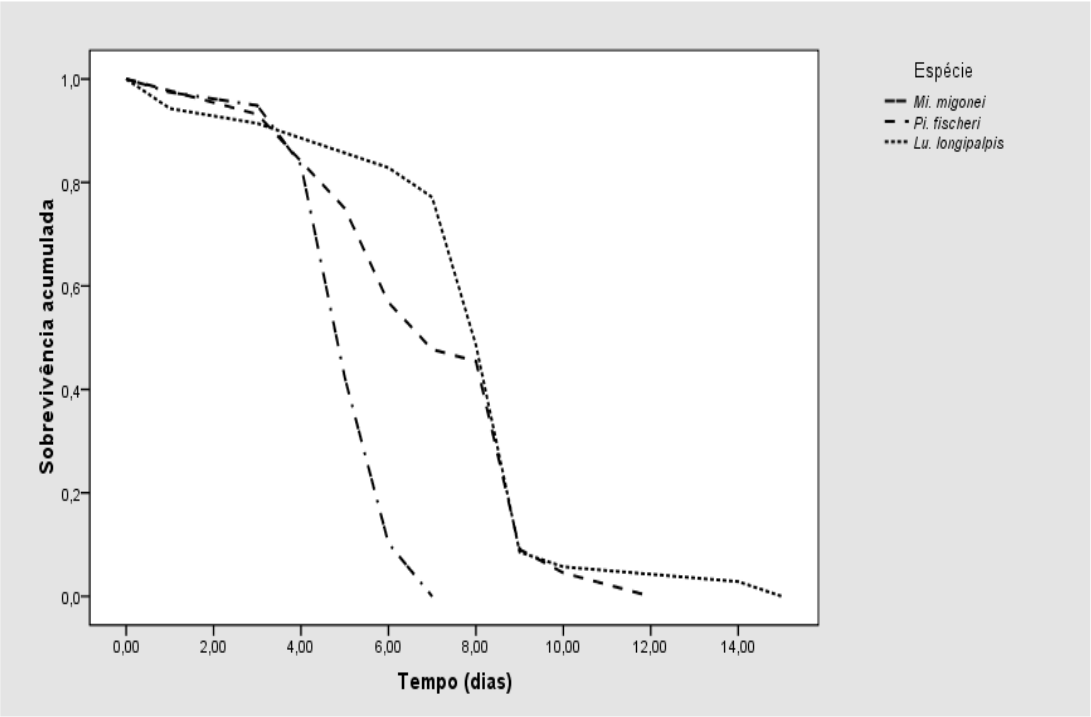

Figura 10. Sobrevivência acumulada de *Lu. longipalpis*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* em cultura sob as mesmas condições ambientais e de exposição à fonte alimentar.

Tabela 17. Valores do χ^2 do teste Log-Rank e os de p, na comparação entre os pares de espécies em estudo.

	Pi. fischeri	***Mg. migonei***	***Lu. longipalpis***
Pi. fischeri	-	33,9 (p<0.0001)	60,3 (p<0,0001)
Mg. migonei	33,9 (p<0.0001)	-	1,453 p>0,05
Lu. longipalpis	60,3 (p<0,0001)	1,453 p>0,05	-

4.5. PROPORÇÃO DE FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM NO CÃO (AI)

Durante os dois experimentos de alimentação das fêmeas em cão infectado pela *L. i. chagasi* as taxas de repasto para *Lu. longipalpis* foram semelhantes, enquanto para *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* variaram segundo a forma de exposição da fonte (Tabela 18).

Para *Lu. longipalpis* as taxas de repasto foram de 71,4% quando as fêmeas foram liberadas na gaiola com o cão exposto (não induzidas) e de 70,8%, quando colocadas diretamente na superfície da pele do cão (induzidas). Para *Mg. migonei* este valores foram de 70% no experimento sem alimentação induzida e 52,2%, quando induzidas a picar. Similarmente para *Pi. fischeri* as taxas variaram de 64,1% e 45,8% respectivamente.

Tabela 18. Número de machos e fêmeas expostos de cada espécie de flebotomíneo, segundo o tipo de exposição ao cão infectado por *Leishmania i. chagasi,* fêmeas alimentadas ou mortas, e proporção de fêmeas alimentadas.

Espécie/repasto	*Lu. longipalpis*		*Mg. migonei*		*Pi. fischeri*	
	I	NI	I	NI	I	NI
Fêmeas	65	63	23	70	*72*	*78*
Machos	60	51	17	38	23	33
Fêmeas alimentadas	46	45	12	49	33	50
Fêmeas mortas	6	9	3	21	24	19
Proporção de fêmeas alimentadas (%)	70,8	**71,4***	52,2	**70,0***	45,8	**64,1***

I: induzida; NI: não induzida**.* AI estimado**.

4.6. DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO

A duração mínima e máxima do ciclo gonotrófico das espécies de flebotomíneos estudadas encontra-se na Tabela 19. A duração mediana do ciclo gonotrófico de *Lu. longipalpis* foi de cinco dias, de *Pi. fischeri,* seis dias e de *Mg. migonei*, sete dias. No entanto, o intervalo entre a mínima e a máxima para esta última foi bem menor do que para as duas primeiras.

Tabela 19. Duração do ciclo gonotrófico em condições de laboratório, 25ºC (±1ºC), ~ 80% UR.

Espécie	N	Mínima (dias)	Máxima (dias)	Mediana (dias)
Lu. longipalpis	120	3	10	5
Mg. migonei	50	7	8	7
Pi. fischeri	64	4	10	6

4.7. HÁBITO DE PICAR AO CÃO (a)

Para efeito do cálculo do parâmetro **a** usado na estimativa da capacidade vetorial, usou-se a taxa de repasto no experimento com alimentação não induzida, levando em conta que as fêmeas na natureza procuram espontaneamente a fonte sanguínea.

Na Tabela 20 são apresentados os valores de **a**, calculados para as três espécies de flebotomíneos estudadas. Os valores de **a** obtidos indicam que, em média, para *Lu. longipalpis,* uma fêmea alimenta-se em cão, uma vez, em 7,14 dias (1/0.14), enquanto uma fêmea de *Pi. fischeri* ou de *Mg. migonei* se alimenta em cão, uma vez, em 10 dias (1/0,10).

Tabela 20. Estimativa do parâmetro “a” para cada uma das espécies em investigação.

Espécie	Taxa de alimentação	Duração mediana do ciclo gonotrófico	**a** “ proporção de repastos por cão por dia”
Lu. longipalpis	0,71	5	0,14
Mg. migonei	0,70	7	0,10
Pi. fischeri	0,64	6	0,10

4.8. PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (n)

Durante os experimentos de infecção experimental foi possível observar formas promastigotas supostamente infectante em uma fêmea de *Pi. fischeri*, pois se localizavam na região próxima à válvula estomodeal, no quarto dia após o repasto infectante.

Para *Lu. longipalpis,* as formas infectantes foram observadas após a dissecção de quatro fêmeas, nos dias 10, 11, 14 e 15 após o repasto infectante. Estas fêmeas já tinham realizado um segundo repasto em hamster. Dado que não foi possível estabelecer o período exato no qual as fêmeas tinham desenvolvido as formas promastigotas infectantes, este dado foi tomado da literatura, na qual se estima entre 6 e 7 dias o período de incubação extrínseca da *L. i. chagasi* (PIMENTA et al., 2011).

Não foi possível observar formas flageladas nas dissecções de *Mg. migonei* e também não se obteve na literatura descrição do período de incubação extrínseca da *L. i. chagasi* nesta espécie. Por esta razão foi assumido o tempo mediano da duração do ciclo gonotrófico (Tabela 19), assumido concordância entre o desenvolvimento das formas metacíclicas e a duração do ciclo gonotrófico, quando a fêmea precisaria fazer um segundo repasto. Estes dados foram resumidos na Tabela 20.

4.9. PROPORÇÃO DE FÊMEAS COM FORMAS INFECTANTES ENTRE AS FÊMEAS INFECTADAS (b)

A infecção por *L. i. chagasi* foi observada em 4 das 91 fêmeas de *Lu. longipalpis* ingurgitadas no cão. Estas 4 fêmeas apresentaram formas promastigotas metacíclicas. Assim a taxa de infecção observada foi 4,4% e a proporção de fêmeas com formas infectantes para esta espécie foi 100% (Tabela 21).

Para *Pi. fischeri,* das 83 fêmeas alimentadas, 4 (4,8%) se infectaram, destas, uma (25%) apresentou formas infectantes.

Durante a dissecção das fêmeas não foi observada presença de parasitas nas amostras de *Mg. migonei.* Portanto, para realizar uma estimativa da capacidade vetorial foi atribuída uma taxa de infecção igual à observada em *Pi. fischeri*.

Tabela 21. Proporção de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* com infecção por *Leishmania infantum chagasi*.

Espécie	Fêmeas ingurgitadas	Fêmeas infectadas	Taxa de infecção	
			Dissecção	**b** “proporção de fêmeas infectadas com formas infectantes”
Lu. longipalpis	91	4	0,044	1,00 (4/4)
Mg. migonei	47	0	0,000	0,25*
Pi. fischeri	83	4	0,048	0,25 (1/4)

* como não se observou a infecção, adotou-se a mesma de *Pi. fischeri.*

4.10. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA (e_{inf})

A expectativa de vida infectiva, estimada a partir da tábua de vida construída com as fêmeas ingurgitadas em cão infectante das três espécies de flebotomíneo (Tabelas 6, 8e 12), é apresentada na Tabela 22.

Para *Lu. longipalpis,* a expectativa de vida infectiva foi de 4,13 dias, para *Mg. migonei,* de 2,42 dias e para *Pi. fischeri,* de 0,74 dias.

Tabela 22. Expectativa de vida para as coortes de espécies de flebotomíneos seguidas a partir do repasto sanguíneo em cão infectado pela *Leishmania infantum chagasi*.

Espécie	n	Expectativa de vida após o repasto
Lu. longipalpis	32	4,13
Mg. migonei	44	2,42
Pi. fischeri	78	0,74

4.11. CAPACIDADE VETORIAL (V)

Os valores dos parâmetros estimados para calcular a capacidade vetorial para cada uma das espécies estudadas são resumidos na Tabela 23.

Tabela 23. Resumo dos parâmetros usados na estimativa da capacidade vetorial de *Lu. longipalpis, Mg. migonei* e *Pi. fischeri,* no presente estudo.

Parâmetro	*Lu. longipalpis*	*Mg. migonei*	*Pi. fischeri*
m (fêmeas/cão/dia)	3,5	0,04	5,5
a [taxa repasto/GC (dias)]	0,14	0,10	0,10
n (Periodo de incubação extrínseca)	6*	7**	4
b (proporção ♀ infectantes)	1,0	0,25	0,25
$\mathbf{e_i}$ [expectiva de vida infectiva (dias)]	4,13	2,42	0,74

*Dado de literatura (PIMENTA et al., 2011); **GC= duração mediana ciclo gonotrófico

Com estas estimativas calculou-se a capacidade vetorial para as três espécies segundo a fórmula:

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

4.11.1. Capacidade Vetorial de *Lu. longipalpis*

$$V_{Lu.l} = (3{,}5 \text{ fêmeas/cão/dia}) * \frac{0{,}70}{5 \text{ dias}} * (1) * (4{,}13 \text{ dias}) =$$
$$= 2{,}02 \text{ novas infecções por dia de exposição de um cão infectado}$$

Este resultado indica que com uma taxa repasto de 70% da população de fêmeas de *Lu. longipalpis* e, dado que todas as que se infectam desenvolvem as formas metacíclicas (as infectivas) da leishmânia, com uma densidade de 3,5 fêmeas/cão/dia, espera-se que a população de fêmeas da área produzam 2,02 novas infecções por dia de exposição da fonte de infecção.

4.11.2. Capacidade Vetorial de *Mg. migonei*

$$V_{Mg.m} = (0{,}04 \text{ fêmeas/cão/dia}) * \frac{0{,}70}{7 \text{ dias}} * (0{,}25) * (2{,}42 \text{ dias}) =$$
$$= 0{,}0024 \text{ novas infecções por dia de exposição de um cão infectado}$$

Este valor indica que com uma taxa repasto de 70% da população de fêmeas de *Mg. migonei* e, dado que 25% das fêmeas que se infectam desenvolvem as formas metacíclicas da leishmânia, com uma densidade de 0,04 fêmeas/cão/dia, espera-se que essas fêmeas produzam 0,0024 novas infecções por dia de exposição da fonte de infecção.

4.11.3. Capacidade Vetorial de *Pi. fischeri*

$$V_{Pi.f} = (5{,}5 \text{ fêmeas/cão/dia}) * \frac{0{,}64}{6 \text{ dias}} * (0{,}25) * (0{,}74 \text{ dias}) =$$
$$= 0{,}108 \text{ novas infecções por dia de exposição de um cão infectado}$$

O resultado indica que com uma taxa repasto de 64% da população de fêmeas de *Pi. fischeri* e, dado que 25% das fêmeas que se infectam

desenvolvem as formas metacíclicas da leishmânia, com uma densidade de 5,5 fêmeas/cão/dia, espera-se que essas fêmeas produzam 0,108 novas infecções por dia de exposição da fonte de infecção.

4.12. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE VETORIAL DAS ESPÉCIES SOB INVESTIGAÇÃO

Os resultados obtidos indicam que em função da densidade do vetor, da sobrevida infectiva das fêmeas e das taxas de infecção observadas nas espécies investigadas no foco da Grande São Paulo, baixas taxas de transmissão de LVA poderiam ser esperadas, quando comparadas com a de *Lu. longipalpis*, vetor comprovado da *L. i. chagasi*. Com estes dados, estima-se que a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* poderia ser 18,7 vezes à de *Pi. fischeri* e 830 vezes à de *Mg. migonei*. Para efeito de análise do papel de *Mg. migonei*, assumindo-se uma taxa de infecção pela *L. i. chagasi* igual à de *Pi. fischeri*, esta última teria uma capacidade vetorial 45 vezes à de *Mg. migonei*.

5. DISCUSSÃO

5.1. DENSIDADE DAS ESPECIES SOB INVESTIGAÇÃO EM RELAÇÃO AO CÃO (m)

A estimativa da capacidade vetorial de uma espécie depende diretamente da densidade, parâmetro calculado como taxa de picadas por hospedeiro ou, incidência de picadas por hospedeiro por dia (GARRETT-JONES, 1964a). O valor deste parâmetro é calculado do produto da densidade do vetor em relação ao hospedeiro (**m**) e o hábito de picar o hospediero (**a**).

Um cálculo exato da densidade dos flebotomíneos que se alimentam em um cão (**m**) é difícil de obter, considerando-se que vários fatores podem influenciar sua estimativa, entre estes, as condições climatológicas, topográficas, o número e distribuição de fontes sanguíneas, entre outros. Por exemplo, GALATI et al (2003) em estudo de atratividade de 6 fontes alimentares para flebotomíneos em ambiente rural, encontraram para *Lu. longipalpis* uma media de 0,14 fêmeas/cão/hora e para machos este valor foi 2,30, enquanto no presente estudo esses valores foram respectivamente 1,16 (3,5fêmeas/3horas) e 8,67 (26/3horas). Coincidentemente, a razão macho/ fêmea foi favorável aos machos nos dois estudos, mas a atratividade do cão para as fêmeas deste flebotomíneo, em ambiente urbano, foi 8,13 vezes maior; resultado este, que parece reflexo da diversidade das fontes sanguineas distinta nas duas áreas. Assim, a capacidade vetorial sofrerá variações em função da quantitidade e diversidade de fontes alimentares.

Apesar da dificulade de se obter, o cálculo deste parâmetro é necessário para observação atratividade natural e interação ambiental vetor-hospedeiro. Durante a realização deste trabalho na região Embu/Cotia, estimou-se para *Pi. fischeri* uma densidade de 5,5 fêmeas/cão/dia e para *Mg. migonei* 0,04 fêmeas/cão/dia.

Considerando-se que os resultados obtidos nas coletas para observação da atratividade do cão foram realizados no período de maior freqüência destes insetos primavera e verão (BARRETTO, 1942; SILVA, 2005; MOSCHIN, 2010) considerou-se estas estimativas, representativas para este período do ano.

Embora o mais apropriado seja comparar a capacidade vetorial entre espécies que ocorram numa mesma área geográfica e tempo, a ausência na região de Cotia/Embu de *Lu. longipalpis,* vetor comprovado de *L. i. chagasi,* forçosamente levou à utilização do valor de **m** calculado para esta espécie (3,5 fêmeas/cão/dia) de uma outra área com transmissão ativa de LVA. Em razão desta diferença de áreas, é possível que a estimativa de **m** das três espécies esteja influenciada pelo número de coletas e das condições climatológicas distintas no período de coleta; todavia o parâmetro obtido possibilitou uma avaliação do comportamento cinofílico das espécies estudas e comparação da capacidade vetorial.

5.2. HÁBITO DE PICAR O HOSPEDEIRO (a)

O hábito de picar o cão (**a**) estima, em média, a proporção de repastos que a população de um vetor obtém de um hospedeiro por dia (GARRETT-JONES, 1964). Em culícideos, este parâmetro é geralmente calculado como o quociente da proporção de fêmeas capturadas com sangue em um domícilio nas primeiras horas do dia e a duração do ciclo gonotrófico. No entanto, este método é pouco prático para espécies de flebotomíneos, com hábito endofílico e endofágico desconhecido. Além disso, com esta metodologia, se os flebotomíneos após o repasto sanguíneo procurassem locais diferentes do canil para se abrigarem, um viés poderia ser introduzido na obtenção do dado sobre a identificação da proporção real de fêmeas alimentadas em cão. Assim, como alternativa para estimar o hábito dos flebotomíneos de picar o cão, adotou-se no presente estudo, o cálculo da proporção de fêmeas se alimentando em um cão em condição

imóvel (anestesiado), dividido pelo tempo mediano (dias) da duração do ciclo gonotrófico.

Embora com esta metodologia a condição imóvel do cão exposto tenha facilitado o contato das fêmeas e estimado a alimentação na presença de uma única fonte sanguínea, permitiu identificar o hábito cinofílico e a intensidade de contato entre a espécie do inseto e o cão.

A duração do ciclo gonotrófico permite identificar o tempo mediano necessário para que o vetor procure um novo contato com esse hospedeiro. Parâmetro este, importante na dinâmica de transmissão da LVA.

Outras metodologias poderiam ser utilizadas para estimar o hábito alimentar, entre estes testes imunológicos e moleculares. Mediante avaliação imunológica, DIAS et al (2003) observaram uma proporção de 27,6% com sangue canino para *Lu. longipalpis*. No entanto índices menores, foram observados respectivamente por OLIVEIRA et al (2008) que observaram uma proporção de 8,3% Além do alto custo, os resultados desta metodologia podem ser influenciados pela diversidade de fontes disponíveis.

Nos experimentos de xenodiagnóstico realizados em cães sintomáticos, a proporção de fêmeas ingurgitadas foi similar para as três espécies estudadas, *Lu. longipalpis* (71%), *Mg. migonei* (70%) e *Pi. fischeri* (64%) (Tabela 17). Considerando-se a igualdade de condições de exposição para as três espécies é importante ressaltar a afinidade pelo cão no hábito alimentar delas. No obstante, na natureza o comportamento de picada pode variar em função de determinadas condições que favorecem a alimentação no hospedeiro, como a proximidade entre o criadouro e a fonte alimentar e exposição do hospedeiro.

Com a metodologia adotada, estimou-se um valor **a** de 0,14 (0,70/5 dias) para *Lu. longipalpis* e de 0,10 (0,70/7 dias) para *Mg. migonei e Pi. fischeri* (0,64/6 dias). Isto indica que uma fêmea de *Lu. longipalpis* alimenta-se pelo menos uma vez em um cão em 7,14, enquanto uma fêmea de *Mg. migonei* ou de *Pi. fischeri* alimenta-se pelo menos 1 vez em 10 dias. Este valor é importante na estimativa da capacidade vetorial, pois, é um indicativo da freqüência de contato vetor-hospedeiro, sendo as espécies com maior

freqüência de repastos, aquelas que terão maior chance de atuar na transmissão do parasita, caso se infectem.

5.3. TAXAS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E PROPORCÃO DE FÊMEAS INFECTADAS QUE REALMENTE SÃO INFECTANTES (b)

Na análise da capacidade vetorial de flebotomíneos, a alimentação de flebotomíneos em cães infectados (xenodiagnóstico) constitui uma etapa fundamental para a avaliação da duração do período de incubação extrínseca da *Leishmania* no inseto, estudar a competência vetorial e realizar inferências sobre as taxas de infecção em determinadas populações.

No presente estudo, as taxas de infecção observadas no exame parasitológico das fêmeas ingurgitadas em cães sintomáticos foram baixas: menos de 5% para *Lu. longipalpis* e *Pi. fischeri*, sem detecção de infecção em *Mg. migonei*. Taxas similares de infecção por xenodiagnóstico em cães poli-sintomáticos foram observadas por TRAVI et al. (2001), que encontraram variação entre 5 e 22,5% para *Lu. longipalpis*. Estes autores não observaram infecção dos flebotomíneos expostos em 50% dos cães sintomáticos. Taxas maiores foram encontradas por Chagas (1940), que observou infecção em 6 de 8 fêmeas de *Lu. longipalpis*. COURTENEY et al (2002) em experimentos de xenodiagnóstico observaram infecção de flebotomíneos variando de 0 e 10% nos insetos alimentados em 11 de 42 cães e, nos espécimes alimentados em outros 24 cães não foi detectada infecção. Este resultado indica que as taxas de infecção do flebotomíneo podem variar em função do cão exposto. Além disto, considerando-se que a dissecção foi realizada após a morte das fêmeas, o valor da taxa de infecção observada pode estar subestimado.

Com relação a proporção de fêmeas infectadas que realmente são infectivas **b,** sua estimativa é necessária em estudos de espécies em que se desconhece a relação entre o vetor e o parasita, pois ainda que, uma fêmea

ingira formas amastigotas durante um repasto sanguíneo no hospedeiro, estas poderiam morrer por ação de enzimas digestivas do inseto ou serem excretadas (KAMHAWI, 2006).

Para *Lu. longipalpis,* as formas promastigotas metacíclicas (infectantes) da *L. i. chagasi* foram observadas em todas as fêmeas infectadas estimando-se o valor de **b** em 1,0. Em *Pi. fischeri* foram observadas em uma fêmea de quatro infectadas, sendo **b** estimado como 0.25. Isto implica que nem todas as fêmeas que se infectaram no cão sobreviveram o tempo suficiente para desenvolver as formas infectantes. No caso de *Mg migonei*, que não foi observada a infecção nas fêmeas, implicaria em considerar que a sua capacidade vetorial seria zero. No entanto, considerando o fato de que as fêmeas foram dissecadas tempos depois da morte, o que implicaria na morte também dos flagelados e conseqüente degradação, dificultando a visualização dos mesmos. Isto, sem dúvida, levaria à subestimação da taxa de infecção. Assim, adotou-se o valor **b** estimado para *Pi. fischeri*, para comparar a relação dos outros parâmetros da capacidade vetorial entre estas duas espécies.

5.4. PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECA (n)

O período de incubação extrínseca permite identificar o tempo necessário para o desenvolvimento das formas promastigotas metacíclicas infectantes da leishmânia no flebotomíneo. A estimativa da duração deste evento é relevante no estudo da capacidade vetorial, pois deste depende diretamente a estimativa da vida infectiva (e_i) da população de fêmeas da espécie estudada. No entanto, estimar quantitativamente este parâmetro requer uma intensa avaliação laboratorial (MEYER, 1989). Assim neste caso poderia ser considerado o tempo mediano de oviposição como o valor de **n,** assumido concordância entre o desenvolvimento do agente e a procura de um novo repasto. Estudos recentes têm mostrado o ciclo de desenvolvimento da *Leishmania* e suas interações no intestino do vetor, e, em geral, estima-se que o tempo necessário para o desenvolvimento de

formas promastigostas metacícilicas varie entre 5 e 7 dias (GOSSAGE et al., 2003, KAMHAWI, 2006, MAIA et al., 2011). No entanto, estes estudos realizam a infecção com uma grande massa de parasitas para garantir a infecção dos insetos.

No presente trabalho, dissecando-se fêmeas mortas de *Pi. fischeri,* observou-se em uma delas promastigotas, supostamente infectantes, localizadas no tubo digestório próximo à válvula estomodeal, quatro dias após o repasto no cão infectado, sendo este o valor de **n** considerado para esta espécie. As formas infectantes em *Lu. longipalpis* foram observadas no 14° e 15° dias após a alimentação no cão. Dado que o tempo mínimo em que as formas tinham se desenvolvido nas fêmeas não foi observado para esta espécie, adotou-se o valor de **n**= 7 dias, descrito por PIMENTA et al. (2011). Em *Mg. migonei* não foi observada infecção pela *Leishmania i. chagasi* e também não se conhecem estudos descrevendo o período de incubação do parasita nesta espécie, portanto, para o cálculo da capacidade vetorial desta espécie, considerou-se a mediana da duração do ciclo gonotrófico, que foi 7 dias, assumindo-se concordância entre o desenvolvimento dos parasitas e o segundo repasto.

5.5. DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS IMATURAS

Pi. fischeri apresentou a maior duração do ciclo de vida (58 dias) e mortalidade (78,3%) durante a fase de desenvolvimento. Estas características poderiam estar associados a fatores intrínsecos da espécie e/ou dificuldades de reproduzir em laboratório as condições em que se desenvolve na natureza, uma vez que se encontra estreitamente associada a ambiente de mata (BARRETTO, 1942). Por outro lado *Mi. migonei* e *Lu. longipalpis,* embora apresentem taxas de mortalidade de até 50%, conseguem se desenvolver com maior facilidade em condições de laboratório, e apresentaram duração do ciclo de vida mais curta (Tabela 13). Isto poderia estar associado a uma maior plasticidade adaptativa dessas espécies a diferentes condições ambientais.

5.6. EXPECTATIVA DE VIDA INFECTIVA DO VETOR (e_{inf})

Da estimativa de sobrevida da população de uma espécie, dependem características como a estabilidade da população do inseto, a proporção dessa população que poderá desenvolver e transmitir um determinado agente e a duração média da vida infectiva (MILBY e REISEN, 1989).

A sobrevida pode ser estimada horizontalmente, mediante a observação em campo de uma coorte por meio de experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura (MILBY e REISEN, 1989; CASANOVA et al., 2009) ou verticalmente, pela taxa de fêmeas multíparas e a duração do ciclo gonotrófico (g), estimando-se como a raiz $g^{ésima}$ da taxa de fêmeas multíparas (MILBY e REISEN, 1989)..

Em laboratório, a sobrevida diária da população de fêmeas também pode ser estimada mediante construção da tábua de vida de uma geração de uma coorte, na qual indivíduos são acompanhados em intervalos de tempo até a morte de todos os espécimes (CAREY, 1993). Esta metodologia oferece a vantagem de estimar a sobrevida em cada intervalo de tempo estudado, permitindo observar o efeito de determinados eventos, como a oviposição na mortalidade da população. A sobrevivência dos flebotomíneos em laboratório geralmente é baixa, principalmente pelas dificuldades em reproduzir as condições do ambiente natural de desenvolvimento desses insetos. Ainda que fatores como a umidade relativa e temperatura sejam mantidas em níveis adequados, outras variáveis como os sítios de repouso, a cobertura vegetal, o ciclo de luz e fontes naturais de alimento são difíceis de recriar, o que pode ter um grande impacto na sobrevivência.

Na literatura, a sobrevivência diária do vetor geralmente é estimada horizontalmente. Para isto, insetos são capturados, marcados com pó fluorescente, liberados e recapturados com armadilhas luminosas, de Shannon ou busca ativa em locais de abrigos próximos ao local de soltura. Com esta metodologia, a sobrevida máxima observada para *Phlebotomus*

ariasi foi de 22 dias (KILLICK-KENDRICK et al. 1984), 11 dias para *Psathyromyia shannoni* (ALEXANDER et al. 1987) e, para *Lu. longipalpis,* 8 dias (MORRISON et al. 1993). Nestes estudos não foram calculadas as probabilidades de sobrevivência diária.

Também, com estimativa horizontal, baseada em experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura, foi observada uma sobrevida máxima para *Ny. neivai* de 11 dias e probabilidade de sobrevivência diária estimada em 0,67 (CASANOVA et al. 2009) e 0,64 (GALATI et al. 2009). Contudo, nestes estudos, as taxas de recaptura foram menores que 20%. Uma limitação para se estimar esses parâmetros diz respeito à representatividade da amostra recapturada em relação à população marcada, pois se desconhece o efeito da migração, mortalidade e atratividade das armadilhas. Outra dificuldade poderia ser o impacto de mudanças nas condições climáticas durante as recapturas, por exemplo, chuvas e ventos fortes que interferem no deslocamento dos espécimes, levando a uma subestimação da população recapturada naquele período. Além disto, para se desenvolver experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura são imprescindíveis altas freqüências da espécie no local estudado, em virtude das baixas taxas de recaptura.

Mediante a construção da tábua de vida da coorte de fêmeas alimentadas em cão, observou-se que as curvas de mortalidade nas três espécies estudadas apresentaram diferentes comportamentos, principalmente durante e após a oviposição. *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* apresentam altas taxas de mortalidade durante a oviposição, fato amplamente descrito na literatura para outras espécies de flebotomíneos (MAROLI et al., 1987, SCHLEIN et al., 1990, EL NAIEM e WARD, 1992), e o número de fêmeas que sobrevivem de *Pi. fischeri* (s=0,42) é menor que as de *Mg. migonei* (s=0,57*),* sendo esta diferença estatisticamente significante (p<0,000). Contrariamente, *Lu. longipalpis* apresenta um comportamento diferenciado (Fig. 12), grande quantidade de fêmeas ovipõem e sobrevivem (s=0,86), sendo a sua sobrevida maior e estatisticamente significante quando comparada com a de *Pi. fischeri* (p<0,000). Esta característica de

Lu. longipalpis tem importantes implicações na sua capacidade vetorial, pois apresenta uma maior chance de contato com um segundo hospedeiro, podendo transmitir a *L. i. chagasi* no segundo repasto (LAINSON et al., 1977).

Neste estudo, em condições de laboratório, observou-se que o tempo de sobrevida máximo para fêmeas alimentadas com sangue foi de 17 dias para *Mg. migonei* (12 dias após o repasto), 20 dias para *Lu. longipalpis* (16 dias após o repasto) e 11 dias para *Pi. fischeri* (6 dias após o repasto). Estes resultados mostraram que as fêmeas de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* poderiam completar 2 e 3 ciclos gonotróficos, respectivamente, enquanto *Pi. fischeri,* dificilmente conseguiria realizar o segundo repasto. Estes dados são similares aos observados por BARRETTO (1942), que verificou um tempo máximo de sobrevivência em laboratório de 27 dias para fêmeas de *Nyssomyia spp*. alimentadas com sangue e açúcar.

A estimativa do tempo médio de vida infectiva para cada espécie foi realizada mediante a observação do período de incubação extrínseca, quando possível, ou, com a duração mediana do ciclo gonotrofico, assumindo-se concordância entre o desenvolvimento das formas infectivas e um novo repasto sanguíneo. O tempo de vida infectiva observado variou entre as três espécies, *Lu longipalpis* apresentou uma sobrevida infectiva média de 4,13 dias, *Mg. migonei* 2,14 dias e *Pi. fischeri* 0,74 dias. Estes resultados indicam que uma fêmea de *Lu. longipalpis* tem uma chance maior de contato com um hospedeiro após se tornar infectiva. Na dinâmica de transmissão da *L. i. chagasi,* isto implicaria que mesmo com uma baixa densidade de fêmeas, esta espécie conseguiria manter a transmissão do agente; levando-se em conta as taxas de infecção e alta sobrevivência. Comparadas a esta espécie, as fêmeas de *Mg. migonei* e de *Pi. fischeri* teriam uma chance menor de contato com o hospedeiro após o desenvolvimento das formas metacíclicas. Portanto, seriam necessárias altas densidades dessas duas espécies para manter a transmissão do agente.

5.7. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE VETORIAL DE *Lu. longipalpis, Pi. fischeri* e *Mg. migonei*

Em estudos sobre a transmissão da malária, MACDONALD (1952) identificou sete fatores principais que poderiam contribuir para o surgimento de um novo caso. Estes parâmetros foram estruturados em uma expressão matemática conhecida como a taxa de reprodução básica da malária. Posteriormente, GARRETT-JONES (1964) introduziu o cálculo do índice de sangue humano e o conceito de capacidade vetorial, estreitamente associado à taxa de reprodução básica da malária. Os parâmetros da capacidade vetorial são amplamente discutidos em REISEN (1989) e têm sido frequentemente utilizados na investigação de doenças veiculadas por artrópodes. De forma geral, a capacidade vetorial abrange a análise de diferentes variáveis ecológicas e epidemiológicas envolvidas na transmissão de agentes por insetos vetores. No entanto, tem sido pouco aplicado ao estudo da transmissão de agentes da leishmaniose na América. No presente estudo, a capacidade vetorial média de *Lu. longipalpis* foi estimada em 2,02 novas infecções por dia de exposição da fonte infectiva, a de *Pi. fischeri* em 0,108 e de *Mi. migonei* em 0,0024. Portanto, a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis*, vetor comprovado da *L. i. chagasi*, é notavelmente maior (18 vezes) que a de *Pi. fischeri* e a de *Mg. migonei* (830 vezes). Vários fatores contribuem para a maior capacidade de *Lu. longipalpis* na transmissão do agente da LVA, entre eles a alta afinidade pelo cão, a forte interação biológica com a leishmânia, a capacidade de adaptação ambiental e as altas taxas de sobrevivência e reprodução. A presença desta espécie com altas freqüência em áreas urbanas (RANGEL e VILELA, 2008; CVE, 2010) é um exemplo de sua capacidade adaptativa.

Também se observou que na área de estudo nos municípios de Cotia e Embu*, Pi. fischeri* tem um maior potencial de transmissão do agente da leishmaniose visceral canina, em comparação a *Mg. migonei.* Isto

acontece, principalmente em função das diferenças observadas na densidade de cada espécie. Embora a quantidade de coletas realizadas para estimar a densidade de ambas tenha sido pouco numerosa, estudos prévios na Grande São Paulo têm mostrado semelhante densidade relativa entre ambas (SILVA, 2005; MOSCHIN, 2011).

Tendo-se em vista a ausência de *Lu. longipalpis*, vetor comprovado da *L. i. chagasi* em outras áreas, os resultados da capacidade vetorial de *Pi. fischeri* e *Mi. migonei* na região Embu/Cotia sugerem que *Pi. fischeri* poderia ter um papel relevante no foco desta região, caso a sua competência vetorial seja demonstrada. Por outro lado, a participação de *Mg. migonei* na área estudada parece menos relevante.

CONCLUSÕES

Em condições de laboratório, *Lutzomyia longipalpis* e *Migonemyia migonei* apresentaram similaridade no tempo de desenvolvimento das formas imaturas. *Pintomyia fischeri* apresentou um ciclo de vida longo e com alta mortalidade durante seu desenvolvimento.

A expectativa de vida infectiva em laboratório de fêmeas de *Lu. longipalpis* após o repasto em cão, foi maior que a de *Pi. fischeri* e de *Mg. migonei*, em condições similares de umidade e temperatura.

A expectativa de vida infectiva em laboratório de *Mg. migonei* foi maior que a de *Pi. fischeri*, observando-se diferenças estatisticamente significantes entre as curvas de mortalidade destas espécies ($p<0,000$).

Em condições similares de exposição, as três espécies sob investigação apresentaram taxas altas de alimentação em cão, demonstrando hábito cinofílico.

À temperatura de 25°C (±1°C) a duração mediana do ciclo gonotrófico de *Lu. longipalpis* foi menor (4 dias) em relação à de *Pi. fischeri* (6 dias) e de *Mg. migonei* (7 dias).

Formas flageladas da *Leishmania i. chagasi* foram observadas em *Lu. longipalpis* e em *Pi. fischeri,* não tendo sido observadas em *Mg. migonei*.

A opção de preservar as fêmeas supostamente infectadas pela *L. i. chagasi* para fins de observação da competência vetorial, dissecando-as apenas quando mortas naturalmente impossibilitou a avaliação da duração do período de incubação extrínseca para para *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei.* Para fins do cálculo da capacidade vetorial, dado de literatura sobre este parâmetro foi utilizado para *Lu. longipalpis* (7 dias) e para *Mg. migonei,* na ausência deste, considerou-se a duração do ciclo gonotrófico. Para *Pi. fischeri* o período de incubação extrínseca observado foi de 4 dias.

Na região Embu/Cotia a densidade de *Pi. fischeri* em relação ao cão é maior que a de *Mg. migonei*.

A capacidade vetorial estimada *de Lu. longipalpis* é 18 vezes à de *Pi. fischeri* e 830 vezes à de *Mg. migonei.*.

A capacidade vetorial de *Pi. fischeri* é 45 vezes à de *Mg. migonei*.

Na região Embu/Cotia, *Pi. fischeri* poderia apresentar importância na transmissão do agente da LVA, caso sua competência vetorial seja demonstrada, enquanto que *Mi. migonei* parece pouco relevante na transmissão da *L. i. chagasi.*

REFERÊNCIAS

Alexander B, Young DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of Leishmania (Viannia) braziliensis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992.87(3):397-403.

Andrade Filho JD, Galati E.A.B, Falcao A. 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 2004; 99 (6) : 597-601 .

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Texeira R & Johnson-JR WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infec Dis. 1986;154:1003-11.

Barretto MP. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1942.

Barretto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP;1943.

Bejarano E, Uribes E, Rojas W, Veléz ID. Presence of Lutzomyia evansi vector of American visceral leishmaniasis in urban área of the Colombian Caribbean coast. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2001;95:27-28.

Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JFL. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:299-306.

Carey JR .Applied demography for biologists. New York: Oxford University, 1993. 206p.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACVMR, & Gontijo CMF. Naturally infected Lutzomyia sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil. Vector-Borne Zoon Diseas.2008;8: 407-414.

Carvalho MR, Valença HR, Da Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira T, Britto C,Brazil RP, Brandão Filho SP. 2010. Natural Leishmania infantum infection in Migonemyia migonei (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica. 116 (1): 108-110.

Casanova C. Avaliação do Potencial Bbiológico de Lutzomyia intermedia s.l. como Vetor da Leishmaniose Tegumentar Americana na Zona Rural do

Município de Conchal, Estado de São Paulo [Tese de doutorado], São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USPU; 2001.

Casanova C, Costa IP, Natal Dispersal pattern of the sandfly Lutzomyia neivai (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(7):719-724.

Casanova C, Natal D, Santos FAM. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. J Med Entomol. 2009;46: 42-50.

Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana/Leishmaniose Visceral Americana. [on line]. Disponível http://www.cve.saude.sp.gov.br [04/08/2009].

Centro de Vigilância Epidemiológica. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. Bepa. 2010; 7:77.

Cipa Group. Computer-aided Identification of Phlebotomine Sandflies of America. 1999. <http://cipa.snv.jussieu.fr > (acessado em 10/08/2009).

Costa AP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de Lutzomyia longipalpis em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1997; 31(6):632-3.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C.Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002.186(9):1314-20.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (Lycalopex vetulus) como reservatórios de Leishmania donovani em área endêmica de calazar no Ceará. Hospital. 1955; 48:61-76.

Dejeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27:305-318.

Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva 1912)(Psychodadae, phebotominae). Cad Saúde Pública. 2003. 19:1373-1380

Endris RG, Young DG, Butter JF. The laboratory biology of the sand fly Lutzomyia anthophora (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1984;21:656-664.

Forattini O P. 1973. Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 658 p.

Forattini OP, Rabello EX; Galati EAB. Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a Lutzomyia longipalpis. Rev Saúde Pública. 1976;10:125-8.

Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo J, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Pat Trop.2003. 32(2): 235-261

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 23-51.

Galati EAB, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA Rocha HC & Garcia WB Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Pública. 1996; 30:115-28.

Galati EAB Nunes VL; Rego-Jr FA, Oshiro ET & Rodrigues M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1997;31(4):378-90.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Gonçalves-Andrade RM, Naufel G. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:641-647.

Galati EAB, Fonseca MB, Marassá A M, Bueno EFM. Dispersal and survival of Nyssomyia intermedia and Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104(8): 1148-1158.

Garrett-Jones C. Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. Nature. 1964;19;(204):1173-5.

Garrett-Jones C.The human blood index of malaria vectors in relations to epidemiological assessment. Bull. Wld hlth org. 1964. 30:241-261.

Gomes AC Controle diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas e Técnicas. Brasília. Fundação Nacional da Saúde,1996.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003.15;33(10):1027-34.

Iversson LB, Camargo ME, Silva EOR, Chieffi PP, Barros JAC. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1979;13:159-167.

Iversson LB, Pires RBR, Ribeiro MA, Takeda AK, Escrivão-Jr A, Tolezano JE, Buralli GM. Investigação de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo. Rev Saúde Pública. 1982;16:205-219.

Kamhawi S. phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. Trends in Parasitology. 2006;22:439-445.

Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD. The establishment,maintenance and productivity of a laboratory colony of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae).J Med Entomol. 1977.13: 429-440.

Killick-kendrick R,. Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtu R, Ward RD, Guilvard E, Perieres J, Dubois H. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Ann Parasitol Hum Comp. 1984.59(6):555-72.

Killick-Kendric R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol.1990;4:1-24.

Killick-Kendrick M, Killick-Kendric R. The initial establishment of sandfly colonies. Parassitologia. 1991;33 (Supl. 1):315-320.

Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis, In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, London, Sydney, Auckland; 2005. p.313-349.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Experimental transmission of Leishmania chagasi, causative agent of Neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly Lutzomyia longipalpis. Nature. 1985. 266: 628-630.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RSM, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1985;79:22-226.

Lino AMCDB, Bichiato AP, Petroni-Jr C, Tanaguchi HH, Tolezano JE, Pereira-Chioccola VL. Leishmaniose visceral em animais domésticos no município de Cotia - São Paulo "relato de casos". Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia; 2003 ago 26-29; Rio de Janeiro, (BR). Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Parasitologia; 2003. p. 294.

Maroli M, Fiorentino S, Guandalini E. Biology of a Laboratory Colony of Phlebotomus perniciasus (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1987; 24(5):547-51.

MacDonald G. The analyses of the sporozoite rate. Trop Dis Bull.1952. 49(6):569-86.

Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votypka J, Volf P. Experimental Transmission of Leishmania infantum by Two Major Vectors: A Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(6): e1181. doi:10.1371/journal.pntd.0001181

Meyer R.P. Pathogen incubation and vector compertence. Bull. Soc. Vector. Ecol. 1989;14:60-66.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França - Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes -Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. 2007; 147:67–76.

Milby MM, Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: Vector survivorship. Bull Soc Vector Ecol.1989.14(1): 47-54.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde/Glossário/ Leishmaniose visceral. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.1990 a 2009. http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf .(Acessado em 20/06/2011).

Mosquin JC. Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) do Parque Estadual da Cantareira (PEC) e Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL) região metropolitana de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

Morrison AC, Ferro C, Tesh R. Host preference of sand fly Lutzomyia longipalpis at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1993;49:68-75.

Myskova J, Svobodova M, Stephen M. Beverley SM, Volf P. A. lipophosphoglycan-independent development of Leishmania in permissive sand flies. Microb Infect. 2007;9:317-324.

Oliveira AG, Marassá AM, Consales CA, Dorval ME, Fernandes CE, Oliveira GR, Brazil RP,Galati EA. 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 Trop. 2008. 107(3):238-41.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Jr HF, Malafronte R.S. Padronização de condições para detecção de DNA de Leishmania spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad Saúde Pública. 2007; 23:87-94.

Pessôa SB, Coutinho JO. Infecção natural de experimental dos flebótomos pela Leishmania brasiliensis no Estado de São Paulo. Hospital. 1941;20:25-35.

Pimenta, PFP, Freitas VC, Secundino NFC. Development of Leishmania chagasi in its natural sand fly vector Lutzomyia longipalpis. 7th International Symposium on Phlebotomine Sand flies, 25-30 April 2011, Turkey.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. 2005. Identification of naturally infected Lutzomyia intermedia and Lutzomyia migonei with Leishmania (Viannia) braziliensis in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2005;99:905-913.

Pita-Pereira D, Cardoso MA,Alves CR, Brazil RP, Britto CC. 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. 2008;107:66-69.

Queiróz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FCA, Souza RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) as a vector of Leishmania braziliensis in Baturité municipality. Amer J Trop Med Hyg. 1994;50:693-698.

Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA. Wermelinger EF. Development of Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna, 1911 in Lutzomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:235-238.

Rangel EF Vilela ML. Lutzomyia longipalpis (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública. 2008;24:2948-2952.

Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: introduction. Bull. Soc. Vector. Ecol. 1989;14:39-40.

Rocha LS, Falqueto A, Dos Santos CB, Ferreira AL, Da Graça GC, Grimaldi G, Cupolillo E. Survey of natural infection by Leishmania in sand fly species

collected in southeastern Brazil. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2010. 104 (7):461-466.

Rogers, ME, Bates PA. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog. 2007; 3(6): e91. doi:10.1371/journal.ppat.0030091.

Santos MFC. Estudo da competência vectorial de Lutzomyia almerioi Galati & Nunes, 1999 para três espécies de Leishmania: L. (Leishmania) infantum chagasi, L. (Viannia) braziliensis e L. (L.) amazonensis. Campo Grande.[Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal; 2007.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol. 1998;12:315-7.

Savani ESMM, Camargo MCGO, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Aria SRN, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (Felix catus) from Cotia county, São Paulo State, Brazil. Vet Parasit. 2005;120:229-233.

Savani ESM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of Lutzomyia almerioi and Lutzomyia longipalpis naturally infected by Leishmania spp. In a cutaneous and canine visceral leishmaniases focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Vet Parasit. 2009;160:18-24.

Schlein Y, Borut S, Jacobson RL. Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of phlebotomus papatasi in the laboratory. Med Vet Entomol.1990;4:69-78.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi-Jr G. 1984. Natural infection of the opossum Didelphis albiventris (Marsupialia, Didelphidae) with Leishmania donovani, in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 9:511.

Silva DA. Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) e suas implicações na epidemiologia das leishmanioses em Cotia, Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo; [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

SPSS para Windows. 2009. Versión 17.0.0. Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <http://www.spss.com/>

SUCEN. Encontro de Lutzomyia edwardsi infectada na região da Grande São Paulo. Rev Saúde Pública 2005; 39:137-138.

SUCEN. Leishmaniose visceral americana. http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/viscer.html (acesso 20/06/2010).

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg. 2001;64(3-4):119-24.

Tolezano JE; Luvizotto MCR; Uliana SRB; Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR; Pinto, PLS; Floeter-Winter LM & Shaw JJ. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma doença emergente em terras paulistas. Rev Soc Brasil Med Trop. 1999;32(Supl. I):218.

Volf P, Myskova J. Leishmania: specific versus permissive vectors. Trend Parasit. 2007;23:91-92.

WHO. Leishmaniases. Burden of disease. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (acessado em 18/06/2011)

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Entomol Insti. 1994;54:1-881.

ANEXOS

ANEXO 1 – Confirmação da Infecção dos Cães Utilizados no Xenodiagnóstico no Presente Estudo

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Estado da Saúde
Diretor Técnico de Departamento: PROF DR ALBERTO JOSÉ S DUARTE - CRM:16915
Av. Dr. Arnaldo 355 - Cerqueira Cesar - 01246-902 - São Paulo - SP
Tel: (11) 3068-2800 - www.lal.sp.gov.br

Emissão: 23/08/2011 11:28
Folha: 1

Nº Requisição: 20110100028901

Registro: 735259H Nome: CAO- BULL
Unidade: CCZ BAURU Sexo: Idade: Entrada em: 28/04/2011 11:16:37
Município: BAURU/SP
Dr. (a): NÃO INFORMADO - CRM:NI

PCR PARA LEISHMANIOSE CANINA - GÊNERO, MAT BIOL

Liberado em: 12/05/2011

Resultado	Método
Positiva	PCR - Amplificação de fragmentos de DNA de Leishmania spp

RICARDO GAVA
CRBio 23269

PCR PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, MAT BIOL MATERIAL BIOLOGIC

Liberado em: 12/05/2011

Resultado	Método
Positiva	PCR - Amplificação de fragmentos de DNA de Leishmania (L.) chagasi

RICARDO GAVA
CRBio 23269

CULTURA PARA LEISHMANIOSE EM MEIOS ACELULARES, MAT BIOL

Liberado em: 10/05/2011

Resultado	Método
Positiva para Leishmania spp	Cultura em meios acelulares

ELAINE APARECIDA DA CUNHA
CRBio 18882/01

SOROLOGIA PARA LEISHMANIOSE CANINA, SORO

Liberado em: 17/05/2011

Resultado	Valores de Referência	Método
Reagente		ELISA

KATIA GOMES CASTELLÃO
CRBio 26619/01

Diretores Responsáveis: CARMEM A. DE FREITAS OLIVEIRA - CRBM:2937 (CI) - MARINA YOSHIE S. MAEDA - CRBM:601 (CP) - MARIA DO CARMO S T TIMENETSKY - CRBM:10075 (CV) - JOSÉ EDUARDO TOLEZANO - CRBio:3768/86 (CPM) - DEISE A. PINATTI MARSIGLIA - CRQ:020164/77 (CA) - TÂNIA MARA IBELLI VAZ - CRBM:0782 (CB) - ADRIANA PALMA DE ALMEIDA - CRBio:18448 (CC)

A interpretação correta dos resultados laboratoriais depende da análise conjunta dos dados clínicos e demais exames e deve ser feita pelo médico.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Estado da Saúde
Diretor Técnico de Departamento: PROF DR ALBERTO JOSÉ S DUARTE - CRM:16915
Av. Dr. Arnaldo 355 - Cerqueira Cesar - 01246-902 - São Paulo - SP
Tel: (11) 3068-2800 - www.ial.sp.gov.br

Emissão: 23/08/2011 11:28
Folha: 2

Nº Requisição: **20110100028901**

Registro: **735259H** Nome: **CAO- BULL**
Unidade: **CCZ BAURU** Sexo: Idade: Entrada em: **28/04/2011 11:16:37**
Município: **BAURU/SP**
Dr. (a): **NÃO INFORMADO - CRM:NI**

SOROLOGIA PARA LEISHMANIOSE CANINA - IFI, SORO

Liberado em: 17/05/2011

Resultado	Valores de Referência	Método
Não Reagente	Não Reagente: Título < 40	Imunofluorescência Indireta (IFI)

KATIA GOMES CASTELLÃO
CRBio:26519/01

Diretores Responsáveis: CARMEM A. DE FREITAS OLIVEIRA - CRBM:2937 (CI) - MARINA YOSHIE S. MAEDA - CRBM:601 (CP) - MARIA DO CARMO S T TIMENETSKY - CRBM:10075 (CV) - JOSÉ EDUARDO TOLEZANO - CRBio:3768/86 (CPM) - DEISE A. PINATTI MARSIGLIA - CRQ:020164/77 (CA) - TÂNIA MARA IBELLI VAZ - CRBM:0782 (CB) - ADRIANA PALMA DE ALMEIDA - CRBio:18448 (CC)

A interpretação correta dos resultados laboratoriais depende da análise conjunta dos dados clínicos e demais exames e deve ser feita pelo médico.

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 04 de novembro de 2009.

Ilmo (a)
Eunice Aparecida Bianchi Galati

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número CEP-IMT 057/2009 e intitulado "Estudo da capacidade vetorial de Migonemyia migonei (França) e de Pintomyia fischeri (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para Leishmania (Leishmania) infantum chagasi Cunha & Chagas e Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna", **sob a sua orientação.**

Atenciosamente

Dr. Paulo Cotrim
Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT

Comissão de Ética
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

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

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

OF.COEP/14/10

5 de março de 2010.

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

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP/FSP, ***analisou****, em sua* ***1.ª/10 Sessão Ordinária****, realizada em* ***19/02/2010****, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS e suas complementares o* ***ADENDO*** *ao protocolo de pesquisa n.º* ***2026****, intitulado* ***"ESTUDO DA CAPACIDADE VETORIAL DE Migonemyia migonei (França) E DE Pintomyia fischeri (Pinto) (Diptera: psychodidae) PARA Leishmania (Leishmania) infantum chagasi Cunha & Chagas e Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna"****, área temática* ***GRUPO III****, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a)* ***Eunice Aparecida Bianchi Galati****, considerando* ***HOMOLOGADA*** *a aprovação* ***"AD-REFERENDUM"****.*

Cabe lembrar que conforme Resolução acima mencionada são deveres do (a) pesquisador (a): ***1.*** *Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;* ***2.*** *Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;* ***3.*** *Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;* ***4.*** *Elaborar e apresentar relatórios parciais e final;* ***5.*** *Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.*

Atenciosamente,

Claudio Leone
Professor Titular
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

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

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Assessoria Acadêmica - CEP: 01246-904 – São Paulo – SP
Telefones: (55-11) 3061-7779 /7742 e-mail: coep@fsp.usp.br site www.fsp.usp.br

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

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

São Paulo, 10 de dezembro de 2009.

Senhora Professora

A Comissão Interna de Biossegurança(CIBio), em sua 2ª reunião Ordinária analisou, quanto aos aspectos de biossegurança, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Díptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas e *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* Vianna, sob a responsabilidade da Professora Associada Eunice Aparecida Bianchi Galati.

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

Atenciosamente

Glavúr Rogério Matté
Professor Associado.
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
FSP-USP

Ilma. Senhora
Eunice Aparecida Bianchi Galati
Professora Associada
FSP-USP.

CURRICULO LATTES – Fredy Galvis Ovallos

Fredy Galvis Ovallos

Bolsista de Mestrado do CNPq

Possui graduação em Biologia (2007)- Universidade de Pamplona (Colômbia). Tem experiência na área da Saúde Pública, atuando principalmente na área da Entomologia médica (Ecologia e taxonomia de Flebotomíneos). Atualmente é Mestrando do programa de Pos-graduação em Saúde Pública , no departamento de epidemiologia da FSP/USP (Brasil) como bolsista do programa PEC-PG do CNPq. **(Texto informado pelo autor)**

Última atualização do currículo em 25/07/2011
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/0162420844956315

Certificado pelo autor em 25/07/11

Dados pessoais

Nome	Fredy Galvis Ovallos
Nome em citações bibliográficas	Galvis F. O.
Sexo	Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
AV. DR ARNALDO 715
CERQUEIRA CESAR
01255-000 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617788

Formação acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 5) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudo da competência vetorial de Migonemyia migonei (França) e de Pintomyia fischeri (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para Leishmania (Leishmania) infantum chagasi Cunha & Chagas, *Orientador:* Eunice Aparecida Bianchi Galati.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico .

2002 - 2007 Graduação em Biologia .
Universidad de Pamplona, U.PAMPLONA, Colômbia.
Título: Estudio Eintomológico en un foco activo de leishmaniosis cutanea en el municipio de Gramalote, Norte de Santander..
Orientador: Claudia Magaly Sandoval.

CURRICULO LATTES – Profª. Drª. Eunice A. B. Galati

Eunice Aparecida Bianchi Galati

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 doutor da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Zoologia, com ênfase em Entomologia Médica, atuando principalmente nos seguintes temas: phlebotominae, psychodidae, leishmaniose tegumentar, taxonomia e epidemiologia. Atulamente desenvolve projeto sobre capacidade vetorial de Phlebotominae em relação às leishmânias: Leishmania braziliensis e Leishmania infantum chagasi. **(Texto informado pelo autor)**

Última atualização do currículo em 12/08/2011

Endereço para acessar este CV:

http://lattes.cnpq.br/1359035734723864

Certificado pelo autor em 12/08/11

Dados pessoais

Nome	Eunice Aparecida Bianchi Galati
Nome em citações bibliográficas	GALATI, E. A. B.;Galati, E.A.B.
Sexo	Feminino

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

2008 Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, *Ano de obtenção:* 2008.
Palavras-chave: cavernas; dispersão; Ecologia de vetores; Fauna flebotomínea; Leishmanioses; ambiente antrópico.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Parasitologia / *Subárea:* Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Zoologia / *Subárea:* Taxonomia dos Grupos Recentes / *Especialidade:*Entomologia Médica.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Ecologia / *Subárea:* Ecologia de Vetores. *Setores de atividade:* Saúde e Serviços Sociais.