Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

CECILIA DE OLIVEIRA LAVITSCHKA

**Competência vetora de *Nyssomyia intermedia* e
Nyssomyia neivai (Diptera, Psychodidae,
Phlebotominae) para *Leishmania* (*Viannia*)
*braziliensis***

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional. Orientador Prof. Dr. Mauro T. Marrelli. Co-Orientadora Prof. Dra. Eunice A. B. Galati

São Paulo

2017

**Competência vetora de *Nyssomyia intermedia* e
Nyssomyia neivai (Diptera, Psychodidae,
Phlebotominae) para *Leishmania* (*Viannia*)
*braziliensis***

CECILIA DE OLIVEIRA LAVITSCHKA

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Lavitschka, Cecília de Oliveira

Competência vetora de *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai* (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Cecília de Oliveira Lavitschka. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Mauro Toledo Marrelli

Descritores: 1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA. 2. LEISHMANIA BRAZILIENSIS. 3. ENTOMOLOGIA MÉDICA.

USP/IMTSP/BIB-02/2017.

Agradecimentos

Sou grata por todo apoio, incentivo e paciência que recebi de minha família especialmente meus pais Ricardo e Regina, pelo apoio incondicional incentivo e proporcionaram condições para minha entrada e permanência nesta jornada. Agradeço também ao meu irmãozinho Augusto pela ajuda e apoio em todos os momentos que precisei.

Sou muito grata ao Caio César Moreira pela gigantesca paciência, atenção e carinho, por estar ao meu lado e me mostrar o caminho nos momentos de angústia e dúvidas.

Ao Prof. Dr. Mauro T. Marrelli, pela orientação, que possibilitou minha entrada no programa de pós graduação do IMT e a Profª Drª Eunice Galati, pela orientação e valiosos ensinamentos, terá sempre minha admiração!

Ao Dr Fredy Galvis, que muito me ajudou desde o primeiro dia que entrei no laboratório e continua me ajudando; por toda explicação e ensinamentos, no campo e no laboratório, pela paciência com meus grandes erros, pela palavra amiga e broncas que me fizeram amadurecer e buscar ser melhor.

À Drª. Claudia Gomes e a Drª. Mara Pinto, que prontamente me auxiliaram.

À Priscila Bassan por todo companheirismo durante estes anos todos.

Agradeço a minhas grandes amigas Morgana Diniz e Bruna Cristine Rodrigues que muito me apoiaram e me auxiliaram com as minhas angústias.

Aos meus amigos e companheiros de pós graduação café e happy hour, tenho um carinho enorme por cada um de vocês, obrigada por dividirem comigo os bons e maus momentos, Mariana Dantas, Filipe Gabriel, Ronan Coelho, Marta Silva, Bruno Nakazato, Rubens Silveira, Rafael Chistie, Sandra Nagaki, Leonardo Suveges, Bruna Demari e Ivy Sá.

Agradeço aos meus queridos companheiros do laboratório, Andreia Brilhante, Filipe Matos, Marcia Bicudo, Rodrigo Godoy, e Carole Mansuor por toda a ajuda e momentos compartilhados.

À Eliane por toda ajuda durante o programa de pós-graduação.

À Fapesp (Processo 2014\19291-8) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que me cederam o ombro amigo e me escutaram nos momentos de dificuldade, e com os quais compartilhei também as alegrias da

pós graduação e a todos aqueles que me auxiliaram durante este processo,
muito obrigada!

Dedicatória

Aos Meus pais

RESUMO

Lavitschka CO. Competência vetora de *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: *Leishmania braziliensis* é o agente responsável pela maior parte dos casos de leishmaniose tegumentar e mucocutânea no Brasil. Entre as espécies incriminadas como vetoras, na região Sudeste encontram-se *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*. A comprovação destas espécies como responsáveis pela transmissão de *Leishmania* sp. depende de vários fatores, entre estes, a competência vetorial, definida como a capacidade da espécie se infectar e repassar a infecção para um hospedeiro vertebrado.

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar experimentalmente a competência vetorial de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* para transmitir *L. braziliensis*. **Métodos:** Fêmeas de primeira geração de ambas as espécies foram alimentadas em hamster infectado com *L. braziliensis* e após a oviposição, desafiados a um segundo repasto sanguíneo em hamsters susceptíveis (limpos). Adicionalmente, foram obtidos dados do desenvolvimento imaturo das duas espécies. **Resultados:** em relação ao ciclo imaturo, observou-se que a maior mortalidade ocorreu no primeiro instar larval para ambas as espécies, 27,6% para *Ny. intermedia* e 53,9% para *Ny. neivai*. O quarto instar larval teve a maior duração, com mediana de 8 a 12 dias. Quanto à susceptibilidade à infecção das fêmeas colonizadas de ambas as espécies 0,89% das fêmeas de *Ny. intermedia* e 8,33 % das fêmeas de *Ny. neivai* apresentaram infecção por *L. braziliensis*. Nenhuma fêmea de *Ny. intermedia* realizou um segundo repasto sanguíneo, enquanto que 3 fêmeas de *Ny. neivai* realizaram. Destas, duas estavam infectadas e o hamster potencialmente infectado ficou em observação por dois meses. Amostras de tecido do hamster exposto demonstraram, por meio de PCR, a presença de *L. braziliensis*. **Conclusão:** *Nyssomyia intermedia* apresentou desenvolvimento de formas flageladas porém não repassou a infecção a um hospedeiro suscetível. *Nyssomyia neivai*, além de se infectar com a *L. braziliensis*, também

repassou a infecção a um hospedeiro suscetível, demonstrando assim sua competência vetora.

Descritores: Leishmaniose cutânea. *Leishmania braziliensis*. Entomologia Médica

ABSTRACT

Lavitschka CO. Vector competence of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Introduction: *Leishmania braziliensis* is the agent related to cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Brazil. Among the sandflies involved in the *Leishmania* sp transmission in the Southeast Region, *Ny. intermedia* and *Ny. neivai* are suspected vectors. However, the incrimination of these species as vectors in the transmission of *Leishmania* sp. depends of several factors, including vector competence, defined as the ability of the species to develop the agent and transmit it to a vertebrate host. **Objective:** The present study aimed to demonstrate the vector competence to *Ny. intermedia* and *Ny. neivai* for *L. braziliensis*. **Methods:** To develop the experiments, specimens of both species were reared under laboratory conditions and the adults obtained were used to evaluate the vector competence. The females were fed in infected hamsters and after oviposition, challenged to take a bloodmeal in susceptible hamsters (without infection). All females fed on infected hamster were dissected. The hamster bitted in the exposition were follow up for two months, after that, were euthanatized to evaluate the infection by PCR. **Result:** The highest immature mortality occurred in the first instar larval for both species, 27.6% for *Ny. intermedia* and 53.9% for *Ny. neivai*. The fourth larval instar had the longest duration, with a median varying between 8 to 12 days. About the females of *Ny. intermedia*, only 0.89% of them develop the flagellates. For *Ny. neivai*, among 36 females feed on infected hamster, 2 were infected. None female of *Ny. intermedia* take a second blood meal and 3 of *Ny. neivai* have had. The hamsters bitted by the infected females were follow up for 60 days. After that the hamster were euthanatized and the infection was observed. **Conclusion:** The vector competence of *Ny. neivai* to transmit *Leishmania braziliensis* was demonstrated. The susceptibility of *Ny. intermedia* to develop this leishmania was corroborated.

Descriptors: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Medical entomology.

SUMÁRIO

1 Introdução	01
1.1 Leishmanioses	01
1.2 Leishmaniose Tegumentar	01
1.3 Vetores de agentes da LT e sua transmissão	04
1.4 Infecção experimental e competência vetora	07
1.5 Espécies em estudo	09
1.5.1 <i>Nyssomyia intermedia</i> s.lat	11
1.5.2 <i>Nyssomyia intermedia</i>	11
1.5.3 <i>Nyssomyia neivai</i>	12
2 Justificativa	13
3 Objetivos	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivo específico	14
4 Material e Métodos	15
4.1 Coleta e obtenção de espécimes	15
4.2 Cultivo e obtenção de espécimes de primeira geração	15
4.3 Repasto infectivo	17
4.4 Transmissão da infecção para hamsters limpos	18
4.5 Aspectos éticos e de biossegurança	18
4.6 Análise molecular	19
5 Resultados	21
5.1 Obtenção de espécimes de primeira geração	21
5.1.1 Esforço de captura	21
5.1.2 Biologia	21
5.2 Experimento de infecção	23
5.2.1 Espécimes de Iporanga	23
5.2.2 Espécimes de Araraquara	25
5.3 Experimento de transmissão do parasito	26
6 Discussão	28
6.1 Esforço de captura	28

6.2 Aspectos da biologia	28
6.3 Infecção experimental	30
6.4 Competência Vetora	32
7 Conclusão	33
Referências	34
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética Animal	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses, conjunto de doenças parasitárias de distribuição global, estão presentes em 98 países ou territórios¹. Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Estes protozoários possuem duas formas em seu ciclo de vida (Figura 1): (a) intracelular amastigotas, encontradas em fagócitos mononucleados de mamíferos e (b) extracelular promastigotas, encontradas no intestino do inseto vetor².

Figura 1 - Formas amastigotas (A) e forma promastigota (B) de *Leishmania* sp.

As leishmanioses podem ser divididas em dois grupos principais, a Leishmaniose Visceral (LV), que acomete órgãos vitais como fígado e baço, e a Leishmaniose Tegumentar (LT) que afeta pele e mucosas.

1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença que acomete o homem desde a antiguidade. Esculturas peruanas (huacos) datadas entre 400-900 d.C. mostram figuras com deformações típicas de lesões cutâneas ou mucocutâneas de leishmaniose³.

A LT é uma zoonose de animais silvestres e, acomete o homem de forma accidental. Contudo, em locais antropizados com presença de animais sinantrópicos e domésticos, a LT pode apresentar um caráter

zooantroponótico⁴. Apresenta alta incidência e ampla distribuição geográfica, com os casos associados geralmente à exposição em áreas de risco e resposta imunológica deficiente do indivíduo. Além disso, mudanças ambientais, como o desmatamento e a migração de pessoas para áreas endêmicas, são fatores que contribuem para a ocorrência de novos casos.^{2, 3, 5, 6}

A distribuição de casos de LT abrange principalmente áreas florestadas rurais com perturbações ambientais. Entretanto, alguns autores sugerem um novo padrão de distribuição associado ao peridomicílio, apontando para a adaptação dos vetores, flebotomíneos, a este ambiente⁷. Seu impacto no âmbito da saúde pública é alto, pois, mesmo não sendo uma doença fatal, causa deformidades que levam a problemas psicológicos, afetando tanto o campo social quanto o econômico.^{6,8} No Brasil, existem sete espécies de *Leishmania* que produzem manifestação tegumentar, são elas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lindenbergi*, sendo que a maior parte dos casos de LT tem sido atribuída a *L. braziliensis*.^{7, 9}

As manifestações clínicas da LT são influenciadas pela espécie de *Leishmania* juntamente com a resposta imunológica do paciente, geralmente caracteriza-se por lesões ulcerosas de fundo granuloso, com bordas salientes de formato arredondado ou ovalado (Figura 2). Estas lesões podem ser únicas ou múltiplas. Com menor frequência, apresentam-se na forma de nódulos ou pequenas pápulas.^{10, 11} Existe ainda a forma mucosa, que afeta especialmente as mucosas da boca e nariz, associada a casos de leishmaniose, cujo agente etiológico é a *L.(V) braziliensis* e, em menor proporção, a *L.(L) amazonensis*.¹²

Apesar de conhecidas pela população de áreas endêmicas, existe negligência frequente por parte desta em relação ao tratamento da doença. Tratamento este quando não oportuno e feito de forma inadequada pode levar a lesões mutiladoras e desfigurantes, causando enorme impacto psicológico social e econômico, especialmente em casos mucocutâneos, resultando em óbito do indivíduo acometido^{3, 5}. Somente no estado de São Paulo, entre 2007 e 2014 ocorreram 2.771 casos de LT. Destes, 70,84% evoluíram para a cura.

Os demais casos evoluíram para óbito por LT ou por outras causas, abandono de acompanhamento, transferência ou mudança de diagnóstico¹³.

Figura 2 - Lesão clássica de leishmaniose tegumentar

Infecções por *Leishmania* spp. causadoras da LT têm sido descritas em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, cuja importância está em seu papel de manutenção do parasito circulante na natureza.^{14, 15, 16, 17} A interação do reservatório com o parasito é um sistema dinâmico que pode sofrer mudanças constantes em função das alterações do meio ambiente.⁶ Tem-se como reservatório natural de leishmânias causadoras de LT o gambá (*Didelphis* spp.), roedores (*Rattus rattus*, *Akodon arviculoides*, *Bolomys lasiurus* e *Nectomys squamipes*) e endentados como o tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) e bicho preguiça (*Choloepus didactylus*), animais estes que raramente desenvolvem lesões leishmanióticas^{11, 18, 19}. Apesar de terem sido descritos casos de LT em animais domésticos, como cães, gatos e equinos, o papel destes na manutenção do protozoário circulante na natureza ainda não está esclarecido. Acredita-se que sejam hospedeiros acidentais da doença, por apresentarem, assim como no homem, lesões ulcerosas^{3, 15, 20}. No entanto, em áreas de colonização antiga e que apresentam altas prevalências da infecção humana, tem sido encontrada associação positiva destas com a presença de cães infectados nos domicílios, aos quais tem sido atribuído o papel de fonte ou reservatório do parasito^{21, 22, 23, 24, 25}. Em relação aos equinos, em áreas onde apresentam altas taxas de infecção, estes animais podem servir de fonte de infecção para os flebotomíneos, contribuindo assim, na infecção do homem e outros animais^{21, 22}.

1.3 VETORES DE *LEISHMÂNIA* E SUA TRANSMISSÃO

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, com quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto^{26, 27} (Figura 3). O desenvolvimento de ovo até adulto apresenta duração média de três a oito semanas²⁸. Sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo em abundância nas regiões tropicais do globo e estão presentes em ambientes silvestres, rurais e urbanos^{10, 8, 27}.

As formas larvais possuem aspecto vermiforme com a presença de falsos pés além de um ou dois pares (dependendo do instar larval) de longas cerdas caudais. Os adultos, por sua vez, apresentam porte pequeno, corpo coberto por cerdas finas, pernas alongadas, asas lanceoladas que permanecem em posição semiereta e afastada da superfície do corpo¹⁰.

Os adultos permanecem em abrigos durante o dia, locais protegidos de grandes alterações ambientais, que podem ou não estar associados aos criadouros naturais ou fontes alimentares²⁹. A hematofagia é realizada somente pelas fêmeas que saem de seus abrigos em busca de repasto sanguíneo no entardecer e durante a noite. Entretanto algumas espécies apresentam registro desta atividade diurna²⁸. O sangue ingerido é utilizado para a maturação dos ovos. Como fontes nutritivas, fêmeas e machos, alimentam-se de açúcares de seiva de plantas e de hemolinfa de afídeos²⁹.

As larvas dos flebotomíneos são terrestres. Seus criadouros reportados compreendem solo em chiqueiros, galinheiros, toca de animais, cavernas, ocos de árvores e outros locais com acúmulo de matéria orgânica³⁰. Porém, dados sobre os criadouros naturais são escassos e poucas são as espécies que têm seu criadouro natural descrito²⁹.

A colonização de espécimes em laboratório é trabalhosa e dificilmente a colônia se mantém em continuidade, com grande número de indivíduos, por muito tempo³¹. As colônias são em geral pouco produtivas, exigem muitas horas de trabalho diário além da dificuldade de se acertar as condições de temperatura umidade e alimentação larval²⁹.

Exceto para uma espécie de *Leishmania* da Austrália que causa infecção em cangurus e com transmissão atribuída a insetos da família Ceratopogonidae³², a transmissão das demais espécies que causam em

humano tanto a forma tegumentar como visceral, se dá pela picada de flebotomíneos. No entanto, estudos sugerem a atuação de outros artrópodes, como carrapato, na transmissão destes agentes, sobretudo da forma visceral para mamíferos não humanos, contudo até o momento sem comprovação^{2, 33,}

34.

Figura 3 - Estágios do desenvolvimento do flebotomíneo *Nyssomyia neivai*. A) Ovo B) larva de terceiro instar, C) Pupa e D) Adulto

As fêmeas de flebotomíneos, das espécies susceptíveis à infecção, infectam-se com o parasito ao ingerirem, durante o repasto sanguíneo, formas amastigotas (intracelulares) da leishmânia presentes nos macrófagos de hospedeiros vertebrados⁷. No tubo digestivo do inseto, as amastigotas dividem-

se e diferenciam-se em promastigotas, formas extracelulares e flageladas. Estas inicialmente transformam-se em formas procíclicas no intestino médio, no interior do bolo alimentar sanguíneo envolto pela membrana peritrófica (MP) e são resistentes à ação enzimática. As formas procíclicas se diferenciam em nectomonas, são maiores que as anteriores e em formato de lâmina, sendo responsáveis pelo escape das leishmânias da MP e pela sua adesão ao epitélio intestinal, evitando desta forma serem excretadas com o bolo alimentar. A seguir aparecem as leptomonas com multiplicação intensa e migração para a região torácica do intestino médio, a seguir surgem as haptomonas e as metacíclicas. No intestino torácico, as promastigotas liberam um gel (promastigote secreted gel – PSG em língua inglesa) na qual permanecem imersas. As haptomonas se prendem à válvula estomodeal secretando substância que a danifica. A predominância no PSG é pelas formas de promastigotas metacíclicas, formas infectivas, estas formam um “plug” localizado posteriormente à válvula estomodeal e final da parte torácica do intestino médio. Nesta situação, quando a fêmea fizer um repasto sanguíneo, o sangue encontrará um bloqueio formado pelo “plug” (PSG + formas promastigotas) e o sangue será regurgitado juntamente com parte do conteúdo deste “plug”. Dessa forma ocorre a transmissão das formas flageladas da *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado^{35, 9, 36, 37}.

Dentre as cerca de 530 espécies de flebotomíneos descritas atualmente para as Américas, aproximadamente 56 delas têm sido implicadas na transmissão das leishmânias.^{38, 39}. Recentemente, as técnicas moleculares têm possibilitado um aumento na identificação das espécies com infecção natural por *Leishmania* spp. Todavia, é importante ressaltar que a identificação da presença de DNA de uma determinada espécie de leishmânia em um flebotomíneo não significa que esta espécie é sua vetora^{40, 3}, uma vez que a presença de DNA de *Leishmania* sp. pode ser devido ao fato da fêmea ter se alimentado em algum animal infectado e sem que possa levar adiante a infecção e transmitir o agente a outro hospedeiro. Portanto, a simples presença do DNA da leishmânia não implica que a espécie tenha competência e capacidade vetorial⁴.

Entre os flebotomíneos apontados como vetores de leishmânias causadoras da LT estão *Migonomyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia*

fischeri, *Pintomyia pessoai*, *Psychodopygus wellcomei*, *Psychodopygus ayrozai*, *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*^{41, 8}.

Algumas espécies de leishmânia apresentam especificidade em relação ao seu vetor, como por exemplo, *Phlebotomus papatasi* e *Leishmania major*, especificidade esta que tem sido entendida como uma co-evolução de ambos⁴². No entanto, esta especificidade nem sempre tem sido observada, e neste caso, os flebotomíneos têm sido considerados como vetores permissivos⁴².

1.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL E COMPETÊNCIA VETORA

O repasto sanguíneo em condições laboratoriais para a observação da infecção experimental dos flebotomíneos pode ser realizada em mamíferos natural ou experimentalmente infectados ou utilizar alimentador artificial. Com o emprego de alimentadores artificiais pode-se utilizar uma quantidade de parasito por ml de sangue que mimetize a de uma fonte natural. Segundo Volf e Volfova³¹ uma carga próxima seria de 10^6 amastigotas por ml⁴³. Nieves e Pimenta⁴⁴ usaram um alimentador artificial utilizando pele de pintinho e sangue heparinizado de rato com uma concentração de 2×10^7 amastigotas por ml.

Além de fatores biológicos, fatores físicos como temperatura também podem influenciar a proliferação da leishmânia, em especial do subgênero *Viannia*, nos primeiros dias de infecção (2-3dia), temperaturas mais elevadas (26°C) fazem as leishmânias se multiplicarem mais rapidamente no intestino do flebótomo do que em temperaturas amenas (20°C)⁴⁵.

A competência vetora é um dos parâmetros definidos por Killick-Kendrick⁴⁶ para caracterizar a capacidade vetora de uma espécie. Os demais parâmetros são: a) antropofilia, b) distribuição coincidente com a distribuição de ocorrência de casos e c) ocorrência em elevada densidade de modo a manter a circulação do parasito na natureza.

A competência vetora define-se, como a capacidade do inseto de se infectar e transmitir o agente patogênico⁴⁶. Isto implica que a espécie deve ser capaz de suportar o desenvolvimento do parasito até a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Este processo implica em permitir a multiplicação da leishmânia em seu organismo, sobreviver a fatores adversos como a ação de

enzimas digestivas e a barreiras físicas da matriz peritrófica, chegar a forma infectante em número abundante, compondo o plug formado pelo PSG + promastigotas, e ser capaz de ser regurgitada num próximo repasto sanguíneo da fêmea deste flebotomíneo. Para que ocorra este repasto infeccioso, o inseto deve sobreviver à oviposição e assim realizar um novo repasto sanguíneo e levar adiante a infecção a um novo hospedeiro.^{47, 3}. Dado a série de fatores adversos até chegar a fase infectante, aproximadamente 50% dos parasitos são mortos nos primeiros dois dias após a infecção³⁵. O ciclo da leishmânia no intestino do vetor até chegar a forma infectante dura em média de 6-9 dias ³⁵.

Poucas são as espécies de flebotomíneos que possuem estudos demonstrando todos estes atributos. Em geral, as espécies apontadas como vetoras apresentam distribuição geográfica coincidente com a dos casos da doença, são antropofílicas e possuem alta frequência em áreas de ocorrência de casos, e em menor número de vezes consegue-se identificar a infecção natural por uma das espécies de *Leishmania*^{46, 48}.

Estudos sobre a competência vetora são escassos. Silva e Gomes⁴⁹, também trabalhando com a *L. braziliensis* tentaram, sem sucesso, demonstrar a competência vetora de *Ny. intermedia* s.lat. A transmissão de *L. braziliensis* via picada de flebotomíneo foi demonstrada para *Leishmania braziliensis* pela picada de *Psychodopygus wellcomei* por Ryan, Lainson e Shaw⁵⁰ naturalmente infectado. Outras leishmânias que tiveram sua transmissão comprovada foram: *L. (L.) major* por *Phlebotomus duboscqi*⁵¹, *L. (L.) tropica* por *Phlebotomus sergenti*, e recentemente Oliveira⁵², demonstrou a transmissão de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* por *Lutzomyia cruzi*.

Alguns estudos apontam diferentes técnicas empregadas para o repasse da infecção: utilização de inoculação, via seringa, em cobaias de formas metacíclicas de leishmânia obtidas de infecção experimental como realizado para *Migonomyia migonei* com *L. braziliensis* e *L. amazonensis*⁴⁴, repasse da infecção através da picada do flebotomíneo naturalmente infectado ao se alimentar em hamsters limpos para fins de implementar colônia de flebotomíneo em laboratório⁵²

1.5 ESPÉCIES EM ESTUDO

Das espécies incriminadas como vetoras da *L (V) braziliensis*, em especial na Região Sudeste, destacam-se *Ny. neivai* e *Ny. intermedia*.

Nyssomyia intermedia foi descrita em 1912 por Lutz e Neiva e *Ny. neivai*, por Pinto em 1926. Esta, logo após sua descrição, foi proposta como sinônimo de *Ny. intermedia*, permanecendo assim até 1996, quando Marcondes⁵³ analisou 750 espécimes provenientes de duas províncias da Argentina e de 12 estados brasileiros e revalidou *Ny. neivai*. Em 2004, Andrade-Filho, Galati e Falcão⁵⁴ redescreveram ambas as espécies baseadas em características morfológicas que facilitam a distinção entre elas (Figura 4) Tais caracteres são a extremidade do filamento genital no macho e características das espermatecas.

Figura 4 - Características da genitália feminina e masculina de *Ny. intermedia* (A) e de *Ny. neivai* (B) (modificado de SHIMABUKURO, GALATI 2011).

Considerando-se o longo período em que estas espécies permaneceram em sinonímia, os estudos realizados nas áreas onde ocorrem simultaneamente, ou seja em simpatria (Figura 5), deixam dúvidas em relação às informações geradas. Para estes dados foi utilizada a designação de *Nyssomyia intermedia* s. lat.

Figura 5 - Municípios do estado de São Paulo com registros para *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* e áreas onde ambas são simpátricas. (fonte dos dados: SHIMABUKURO, GALATI 2011; SANTOS et al 2009)

Nyssomyia intermedia s. lat. encontra-se distribuída por praticamente todo o estado de São Paulo. Após a revalidação de *Ny. neivai* os estudos vêm apontando a sua ocorrência no Planalto Paulista, e em simpátria com *Ny. intermedia*, em alguns municípios não litorâneos no Vale do Ribeira e Vale do Paraíba^{55, 56}. *Ny. intermedia*, além das áreas em simpátria com *Ny. neivai*, tem sido assinalada nos município litorâneos. Nos demais municípios do estado de São Paulo, *Ny. neivai* tem ampla distribuição e naqueles da Região Sul do Brasil, Argentina e Paraguai. Na Região Centro-Oeste a sua presença foi assinalada na área sul do Estado e de Mato Grosso do Sul inclusive no distrito de Águas do Miranda, às margens deste rio no município de Bonito. *Nyssomyia intermedia* ocorre nos estados litorâneos da Região Sudeste e Nordeste assim como em Minas Gerais. A distribuição em simpátria em áreas mais no interior do Brasil ainda necessita de investigação.

1.5.1 NYSSOMYIA INTERMEDIA, s. lat.

Nyssomyia intermedia s. lat. é um táxon antropofílico, encontrado em vários focos de LT. Tem-se observado sua presença próximo a residências sugerindo sua atuação na veiculação de endemias sendo grande suspeita de transmitir a *L. braziliensis* em São Paulo ^{57, 58, 7}.

1.5.2 NYSSOMYIA INTERMEDIA

Os primeiros dados sobre a infecção natural deste flebotomíneo foram descritos por Aragão⁵⁹ que observou a infecção natural desta espécie por *Leishmania* spp. A infecção natural por *Leishmania braziliensis* foi descrita por Rangel et al ⁶⁰ em Jacarepagua-RJ. A capacidade de desenvolver o parasito foi demonstrada por meio de infecções experimentais em laboratório por Rangel et al⁶¹.

Sua ocorrência abrange os estados do Piauí, Ceará, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e São Paulo³⁹. Especificamente no estado de São Paulo pode ser encontrada nos municípios de Bananal, Barra do Turvo, Cananéia, Caraguatatuba, Ilha Bela, Iporanga, Itariri, Juquiá, Pariquera Açu, Pedro Toledo, Ribeirão Grande, São Sebastião, Taubaté e Ubatuba^{62, 56, 63}.

1.5.3 NYSSOMYIA NEIVAI

Nyssomyia neivai é uma espécie oportunista cujo hábito alimentar é moldado de acordo com a disponibilidade de hospedeiros⁶⁴. Está presente em alta densidade em áreas com transmissão da LT sendo incriminada como vetora de *L. braziliensis* nas regiões Sul e Sudeste do país⁶. Sua infecção natural por *Leishmania infantum chagasi* foi descrita em Minas Gerais por Saraiva et al⁶⁵, através de inoculação da leishmânia observada na região pilórica do flebotomíneo na pata de um hamster e posteriormente realizado análise de PCR. Já pela *L. braziliensis* foi descrita no Rio Grande do Sul e Paraná^{66, 67} sendo que neste último os espécimes eram provenientes de áreas intra domiciliares. Quanto à sua distribuição geográfica *Nyssomyia neivai* é

encontrada no Pará, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No estado de São Paulo está presente no Planalto Paulista, Vale do Ribeira e Vale do Paraíba^{63, 56}.

2 JUSTIFICATIVA

A LT é uma doença que merece atenção, pois, além de seu alto poder de gerar deformidades os números de casos e de localidades de ocorrência sofreram um aumento significativo nos últimos anos no Brasil.⁶ O número de casos reportados por ano, no período de 2003-2007 foi de 26.008 casos, todavia acredita-se que possa chegar a 72.800 casos devido a subnotificações⁶⁸.

Estudos sobre a competência vetorial de espécies suspeitas e/ou consideradas como vetores são necessários, pois comprovariam o papel vetor da espécie e, conseqüentemente, gerariam informações relevantes para elaboração de indicadores na avaliação de risco de transmissão da doença, possibilitando, a partir destes, a elaboração de medidas que visem o controle e prevenção mais eficazes⁶.

O encontro da infecção natural em *Nyssomyia neivai*, juntamente com sua antropofilia, distribuição geográfica coincidente com áreas de ocorrência de LT e sua provável semelhança com *Nyssomyia intermedia*, em termos de suscetibilidade à infecção por *L. braziliensis* endossam a necessidade de se investigar a sua competência vetorial das espécies envolvidas na transmissão da LT^{54, 67}.

Dado o exposto, e tendo em vista que *Nyssomyia intermedia*, s.lat. é considerada pelo Ministério da Saúde uma dos principais vetores da LT, faz-se necessário que ambas as espécies deste complexo, *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*, sejam avaliadas quanto à capacidade de transmitir a leishmânia, experimentalmente através da picada. Isto porque ambas já foram encontradas naturalmente infectadas por *L. (Viannia) sp.* e, experimentalmente, desenvolvem a forma infectiva do parasito⁴¹. Ademais, a demonstração deste parâmetro é um dos requisitos para a comprovação definitiva da espécie como vetora.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em laboratório, a competência vetora de *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai* para *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Observar a presença de promastigotas no tubo digestório de ambas as espécies;

b) Acompanhar a sobre vida de ambas as espécies após alimentação em repasto infeccioso;

c) Obter informações sobre o desenvolvimento do ciclo de vida de ambas as espécies, e

d) Avaliar a transmissão de *L. braziliensis* a hospedeiro suscetível por ambas as espécies *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*

4 MATERIAL E METODOS

4.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Espécimes de *Ny. neivai* e *Ny. intermedia* foram coletadas no bairro Serra, município de Iporanga – SP, O município está localizado no Vale do Ribeira e entre os anos de 2014 a 2016 foram diagnosticados 23 casos autóctones de LT⁶⁹. Para a obtenção da F1. Os insetos foram coletados com armadilhas luminosas tipo CDC e com armadilhas de Shannon modificadas⁷⁰ nas cores preta e branca. Também foram realizadas capturas em substratos utilizados pelos espécimes para pouso: paredes e teto de abrigos de animais domésticos e tronco de árvores ou mourões de cerca. As armadilhas tipo CDC ficaram expostas por um período de 12 horas, das 19:00 às 07:00 horas, enquanto que as capturas em armadilhas de Shannon e em outros substratos ocorreram das 19:00 às 23:00 horas. Após a captura, os flebotomíneos foram transportados para o laboratório LESP/ Phlebotominae (FSP/USP) em gaiolas de tecido ou em potes plásticos individuais, cobertos com tecido úmido e acomodados no interior de caixas de isopor para a manutenção de temperatura e umidade.

4.2 CULTIVO E OBTENÇÃO DE ADULTOS DE PRIMEIRA GERAÇÃO

No laboratório, o processo de cultura dos flebotomíneos foi realizado de acordo com o proposto por Killick-Kendrick e Killick-Kendrick⁷¹ com modificações⁷². Como fonte sanguínea foram utilizados hamsters anestesiados. A anestesia foi realizada por aplicação intramuscular na dose: cloridrato de ketamina (15 mg/kg) +cloridrato de xilazina (0,05 mg/kg) de acordo com o peso corporal do animal. Após a anestesia o hamster foi colocado em uma gaiola contendo os flebotomíneos por um período de até 50 min. Uma vez ingurgitadas, as fêmeas foram individualizadas em tubos de acrílico transparentes contendo gesso umedecido para a oviposição (Figura 6). A manutenção dos espécimes ocorreu a uma temperatura de 25+- 1°C e umidade de 70%.

Figura 6 - A) gaiola utilizada para manter os espécimes de flebotomíneos. B) Recipiente utilizado para individualização das fêmeas

Adicionalmente, foi oferecido como fonte de carboidratos um algodão embebido em solução de água com açúcar a 10%.

Após a oviposição, as fêmeas foram identificadas ao nível de espécie de acordo com Galati³⁹ e os ovos foram agrupados por espécie e transferidos para uma placa de Petri contendo gesso umedecido e com uma pequena porção de alimento (uma mistura de terra com fezes de galinha) para a alimentação das larvas (Figura 7).

Figura 7 - Placa de Petri utilizada para o seguimento dos imaturos das espécies estudadas

Uma amostra, dos ovos, foi seguida diariamente para obtenção de dados relativos à duração do ciclo ovo adulto e mortalidade. Uma amostra de *Ny. intermedia* (n= 209) e de *Ny. neivai* (n=31) foi analisada quanto a influência do papel de filtro na oviposição, por meio do teste do Qui-quadrado, com $\alpha = 5\%$, e graus de liberdade =1. Após a emergência, os adultos (machos e fêmeas) foram transferidos para gaiolas de tecido para realização dos experimentos de infecção.

Devido ao pequeno número de espécimes de *Ny. neivai* coletados no município de Iporanga, solicitamos à Prof Dr^a Mara C. Pinto do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Campus Araraquara, a doação de 100 fêmeas desta espécie proveniente de uma colônia de 15^o geração, as quais foram submetidas ao repasto infectivo.

4.3 REPASTO INFECTIVO

Para a infecção das fêmeas de flebotomíneos, provenientes de F1, foram colocadas em gaiolas e desafiadas a se alimentar em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, cepa *L. braziliensis* 15280. Os hamsters foram obtidos do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FMUSP e mantidos no Biotério. Os hamsters foram anestesiados conforme a metodologia para a obtenção de espécimes de primeira geração. Para cada experimento foram utilizadas fêmeas a partir do 2^o dia de emergência. As fêmeas depois de ingurgitadas tiveram como oferta de alimento um algodão embebido com solução de açúcar a 10%. Parte delas foi individualizada em tubos de acrílico enquanto a outra parte das fêmeas foi mantida em gaiolas de tecido, ambos em uma temperatura de 25 ± 1 °C e umidade aproximada de 80%.

Com espécimes provenientes da colônia de Araraquara foi utilizada a mesma metodologia para alimentação, porém foram mantidos somente em gaiola e em temperatura pouco mais elevada, ca. 27°C, e umidade próxima de 80%.

As fêmeas foram acompanhadas diariamente, duas vezes ao dia, em intervalos de 12h. As que morreram antes ou durante a oviposição foram dissecadas para observação da presença/ausência de flagelados. Este

intervalo de tempo é importante, pois mais tempo após a morte da fêmea o parasito também morre inviabilizando sua observação.

Para realizar a dissecação (Figura 8), cada fêmea foi colocada em uma lâmina contendo uma gota de solução fisiológica. Com auxílio de dois estiletes (Figura 8A) retirou-se as pernas e asas. Em seguida, a cabeça foi separada do restante do corpo. Após este procedimento um estilete foi posicionado no tórax mantendo o espécime fixo, enquanto com o outro se realizou um pequeno corte próximo ao oitavo segmento abdominal até a metade de seu diâmetro. Tendo-se o tórax ainda fixo, com o outro estilete apoiado entre o 8º e 9º tergitos foi feito um movimento de tração em sentido posterior ao abdômen para soltar o intestino juntamente com a genitália do resto do abdômen. (Figura 8C). Após o procedimento foi colocada uma lamínula em cima do intestino e utilizando-se de um microscópio óptico este intestino era analisado para a busca da presença da leishmânia, local e, especialmente sua forma, para saber se era ou não uma forma infectiva.

4.4 TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO PARA HAMSTERS LIMPOS

Ao final da digestão do repasto sanguíneo infectivo e a oviposição, foi oferecido às fêmeas como fonte sanguínea hamsters limpos, para um segundo repasto. As fêmeas que se alimentaram novamente foram acompanhadas e dissecadas para observação de flagelados no tubo digestivo.

O hamster limpo picados pelos flebotomíneos infectados foi sacrificado e encaminhado para análise de PCR para averiguar a presença de leishmânia em fragmentos de tecidos.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Os flebotomíneos foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae (FSP/USP) cujas janelas e portas são vedadas além da presença de uma cortina de ar na porta para evitar a fuga de insetos. Durante todo o trabalho, os flebotomíneos foram mantidos em gaiolas em uma área isolada do restante do insetário, enquanto que os hamsters utilizados como fonte sanguínea foram alocados em outra área do insetário, igualmente isolada.

O projeto foi submetido ao comitê de ética do Instituto de Medicina tropical e aprovado sob o número CPE-IMT\000297A(Anexo I).

Figura 8 - A) estiletas entomológicas para dissecação B) posição da fêmea para realizar a dissecação. C) espécime sem o intestino, seta apontando o intestino.

4. 6 ANÁLISE MOLECULAR

As análises moleculares foram realizadas pelo laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP. Primeiramente realizou-se a extração do DNA de amostras de tecido do hamster. O procedimento foi realizado em colunas de sílicas, de acordo com as instruções do fabricante do Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha). Foram

utilizados os Primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGG TCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'- ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') que flanqueiam uma sequência encontrada no DNA dos minicírculos de *Leishmania*, originando um produto com 120 pares de base⁷³. A PCR foi realizada em microtubos estéreis com volume final de 20 µL contendo 4 µL de água ultrapura (Promega- EUA), 10 µL de Master Mix Go Taq Green 2x (Promega - EUA), 1 µL de cada *primer* a 300 nM final e 4 µL de DNA extraído das biópsias. As condições de amplificação do DNA foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um ciclo final de 8 minutos a 72°C foi realizado para a extensão completa dos fragmentos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% em corrida com tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), pH 8,3.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES DE PRIMEIRA GERAÇÃO

5.1.1 ESFORÇO DE CAPTURA

De julho de 2014 a julho de 2016 foram realizadas nove coletas no município de Iporanga, tendo sido coletados um total de 1.303 insetos (Tabela 1). Os espécimes coletados foram identificados como *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai*. O número de fêmeas que se alimentou e ovipos e o número de ovos por espécie estão descritos conforme tabela 1.

Excluindo-se a coleta de maio de 2016, os demais exemplares foram usados para obtenção de uma F1 e durante o período de observação dos imaturos foram obtidas informações a respeito da biologia das espécies.

5.1.2 BIOLOGIA

Do total de ovos seguidos de *Ny. intermedia*, 38,4% eclodiram e a mediana de tempo de duração do ovo até adulto foi de 35 dias. O 4º instar larval apresentou maior duração (8 dias) e o 2º instar o de menor duração (4 dias) (Figura 9).

Figura 9 - Duração mediana (dias) de cada fase imatura de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, temperatura (25°C +1), umidade relativa (70%).

Tabela 1 - Total de espécimes coletados em Iporanga e Número de fêmeas ingurgitadas, número de ovos obtidos segundo espécie e mês coleta.

Coleta		<i>Ny. intermedia</i>			<i>Ny. neivai</i>		
Data	Nº coletados	Alimentadas	Oviposição	Nº de ovos	Alimentadas	Oviposição	Nº de ovos
Ago\2014	197	22	14	384	7	4	118
Dez\2014	138	26	18	456	9	9	265
Fev\2015	97	9	6	236	1	1	33
Mar\2015	105	12	9	249	3	2	64
Jun\2015	400	214	208	7305	29	28	869
Set\2015	113	37	8	290	8	8	102
Dez\2015	189	69	52	-	16	10	140
Abr\2016	72	23	22	517	6	6	43
Mai\2016	3	-	-	-	-	-	-
TOTAL	1303	412	337	9437	79	68	1634

Nyssomyia neivai apresentou eclosão dos ovos de 39,7%. O período de ovo a adulto, em dias, teve uma duração mediana de 40 dias. A exemplo de *Ny. intermedia*, *Ny. neivai* também apresentou uma duração mediana maior no 4º instar larval (12 dias) e menor no 2º instar (4 dias).

Para as fêmeas de *Ny. intermedia* foi observada uma média de 34,1 ovos por fêmea, enquanto que para *Ny. neivai* esse valor foi de 23,0 ovos, sem diferença estatística entre as médias.

O número de fêmeas que realizou a oviposição não foi influenciado pelo uso ou não do papel de filtro como suporte, segundo o teste de Qui-quadrado. para *Ny. intermedia* apresentou um $\chi^2 = 1,7$ e *Ny. neivai* $\chi^2 = 0,74$, resultando no aceite da hipótese de independência entre as variáveis.

Mais da metade das larvas que eclodiram não chegou à fase adulta, sendo que a mortalidade total variou entre 64,25% para *Ny. intermedia* e 71,1% para *Ny. neivai*. A maior mortalidade foi observada no 1º instar para ambas as espécies, sendo o valor observado para *Ny. neivai*, 53,9%, maior que o observado para *Ny. intermedia*, 27,66%. Na sequência, a fase de pupa para *Ny. intermedia* com 18,3% de mortas e para *Ny. neivai* o 4º instar larval com 6,25% (Tabela 2).

Tabela 2 - Proporção da mortalidade por estágio imaturo de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*.

	Proporção de mortalidade do fase imatura (%)					Total
	*L1	*L2	*L3	*L4	Pupa	
<i>Ny. intermedia</i>	27,6	2,5	10,2	5,5	18,3	64,2
<i>Ny. neivai</i>	53,9	2,3	3,1	6,2	5,5	71,1

*L: instar larval

5.2 EXPERIMENTOS DE INFECÇÃO

5.2.1 ESPÉCIMES DE IPORANGA

No total 717 fêmeas de *Ny. intermedia* e 64 de *Ny. neivai*, provenientes de F1, foram desafiadas a se alimentarem em hamsters infectados. Das fêmeas de *Ny. intermedia* 15,6% se alimentaram, enquanto que para *Ny. neivai* esta porcentagem foi 4,7% (Tabela 3).

Das 112 fêmeas de *Ny. intermedia* alimentadas em hamster infectado, uma fêmea desenvolveu infecção por *Le. braziliensis* (0,89%). Neste espécime foi observada pequena quantidade de parasitos na região mediana no intestino com 2 dias após o repasto infectivo. Dentre as fêmeas de *Ny. intermedia* que realizaram a alimentação em hamster infectado, 83 foram individualizadas em tubos de acrílico e nenhuma sobreviveu à oviposição, o que impossibilitou a tentativa de um segundo repasto em hamster limpo. Destas todas foram dissecadas uma apresentou formas promastigotas, observadas através de microscopia, todavia não eram formas infectivas.

Na tentativa de aumentar a sobrevivência das fêmeas, 29 fêmeas foram mantidas em gaiola de tecido após o repasto em hamsters infectado. Destas 10 sobreviveram à oviposição (3 a 4 dias). Todavia, em nenhuma delas foi observada a infecção na dissecação.

Tabela 3 – Grupo colonizado: número total de espécimes expostas, alimentadas e infectadas.

Espécie	Total de expostas	Total de alimentadas	% de alimentação	Total de infectadas	% de infectadas
<i>Ny. intermedia</i>	717	112	15,62	1	0,89
<i>Ny. neivai</i>	64	3	4,76	0	0
Total	781	115	14,7	1	0,89

Além de desafiar espécimes obtidos em cultivo em laboratório, espécimes silvestres coletados em Abril de 2016 foram desafiados a se alimentarem em hamster infectado (Tabela 4). Entre as 22 fêmeas ingurgitadas, uma fêmea de *Ny. intermedia* desenvolveu a infecção, apresentando flagelados na região posterior do tubo digestivo.

Tabela 4 - Número e porcentagem de fêmeas silvestres expostas, alimentadas e infectadas.

Espécie	Número de expostas	Número de alimentadas	% de alimentação	Número de infectadas	% de infectadas
<i>Ny. intermedia</i>	23	22	95,6	1	4,54
<i>Ny. neivai</i>	6	6	100	0	0
Total	29	28	96,5	1	4,54

5.2.2 ESPÉCIMES DE ARARAQUARA

Das 100 fêmeas, 33 se alimentaram em hamster infectado sendo 28 delas acompanhadas diariamente. Destas, 32,14% morreram no quarto dia após o repasto sanguíneo em hamster alimentado (Tabela 5).

Tabela 5 – Mortalidade das fêmeas de *Ny. neivai* obtidas da colônia de Araraquara após repasto em hamsters infectado

Dias após repasto	Nº de mortas	%
1	1	3,60
2	3	10,71
3	4	14,30
4	9	32,14
5	3	10,71
6	2	7,14
7	0	0
8	3	10,71
9	0	0
10	3	10,71
Total	28	100

Das fêmeas alimentadas, 24 (85,7%) sobreviveram três ou mais dias. Duas delas estavam infectadas, a primeira morreu no terceiro dia após a alimentação, apresentando infecção leve de formas flageladas na região mediana do tubo digestivo e sem resquícios de sangue ou ovos. A segunda morreu no oitavo dia após a alimentação infectiva apresentando infecção

moderada por flagelados, na região mediana do intestino. A taxa de infecção observada das fêmeas de *Ny. neivai* foi de 7,14%.

5.3 EXPERIMENTO DE TRANSMISSÃO DO PARASITO

Na realização de experimentos para avaliar a competência de uma espécie é imprescindível que as fêmeas realizem pelo menos dois repastos sanguíneos, com intervalos compatíveis para o desenvolvimento das formas infectantes, geralmente coincidente com o período entre repasto e oviposição. No total, 10 fêmeas de *Ny. intermedia* que sobreviveram à oviposição e foram desafiadas a se alimentarem em um hamster sadio, nenhuma se alimentou. Também não apresentaram flagelados no tubo digestivo quando dissecadas.

Das 21 fêmeas provenientes da colônia de Araraquara expostas a um segundo repasto sanguíneo em um hamster susceptível, três realizaram o repasto, respectivamente, no terceiro, quarto e quinto dia após o repasto infectivo. A fêmea que se alimentou no terceiro dia morreu no dia seguinte, apresentando sangue no intestino e não estava infectada. A que realizou o segundo repasto no quarto dia foi esmagada pelo hamster e não pôde ser observada. A fêmea que picou o hamster limpo no quinto dia morreu três dias após o segundo repasto, realizou uma segunda oviposição completa, e apresentou infecção por flagelados na região mediana do tubo digestivo (Figura 10).

Figura 10 - Microfotografia do intestino de uma fêmea de *Ny. neivai* infectada com flagelados após realizar o segundo repasto sanguíneo.

O hamster em observação morreu dois meses depois, sem demonstrar sinais clínicos da doença e foi realizada análise de PCR em amostras de tecido (pele), apesar de leve, uma das amostras obteve resultado positivo para leishmânia (Figura 11).

Figura 11 - Resultado de PCR para detecção de leishmânia em amostras de pele, sendo a amostra 3 positiva para leishmânia. PM- peso molecular; Biópsia pele hamster- sitio 1; Biópsia pele hamster sitio 2; Biópsia pele hamster no qual a fêmea infectada se alimentou sitio 3; Paciente HC- RG: 14174666J ; CP- *L. braziliensis* cepa 15280- controle positivo; CP- *Leishmania chagasi* cepa 46- controle positivo; CN- controle negativo

6 DISCUSSÃO

6.1 ESFORÇO DE CAPTURA

O baixo número de espécimes capturados na coleta realizada no mês de maio pode ser resultado de mudanças no local de captura, como resultado da retirada de animais domésticos (gado, galinhas, porcos) para a implantação de plantio de cultivares, palmito, (Figura 13). Em 2014 a área era predominantemente um pasto com animais soltos além de uma área com mata. Em 2015 os animais e o pasto foram retirados e foi plantado palmito. No último ano, 2016, grande parte da mata foi retirada para abrir espaço para o plantio de mais palmito.

6.2 ASPECTOS DA BIOLOGIA

Nyssomyia neivai apresentou maior duração do ciclo de ovo adulto (40 dias) e maior mortalidade (71,1%) do que *Ny. intermedia* (35 e 64,25% respectivamente). O primeiro instar larval apresentou a maior mortalidade para ambas as espécies, o que pode estar associado a presença de fungos filamentosos nos quais as larvas se enroscavam e morriam por não conseguirem se soltar. A mortalidade observada pode estar associada, também, à dificuldade de se reproduzir as condições naturais onde se desenvolvem estas espécies.

A duração do ciclo de ambas as espécies foi menor que o observado em estudos com as mesmas espécies, *Ny. intermedia* (34,9 dias) e *Ny. neivai* (45 dias), assim como de outras tais como *Migonemyia migonei* (47,5 dias), *Lutzomyia longipalpis* (46,5 dias) e *Pintomyia fischeri* (47,5 dias)^{72, 54}.

Figura 13 - Mudança na paisagem local ao longo do período de estudo: A) local de coleta em Iporanga Julho 2014. B) Local de coleta em Iporanga Julho 2015. C) Local de coleta Maio 2016.

Nyssomyia neivai apresentou um número de ovos postos por fêmea pequeno (24 ovos) quando comparado com outros estudos. Fatores físicos como temperatura e umidade podem ter interferido na oviposição. Andrade-Filho⁵⁴, utilizando a mesma temperatura e umidade cerca de 10% maior que a utilizada no presente estudo, observaram uma média de ovos por fêmeas de *Ny. neivai* de 48,5 ovos. O número de casais mantidos juntos e o tamanho do

local onde permaneceram também podem ter interferido na média de ovos, pois Goulart et al⁷⁴, em umidade de cerca de 80%, obtiveram entre 47,1 e 67,2 ovos por fêmeas, com cinco casais em recipientes de 150ml resultando na maior média de ovos.

6.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Ny. neivai, provenientes da colônia da Unesp Araraquara, apresentou uma taxa de infecção maior (7,14%) que a de *Ny. intermedia*, tanto colonizada (0,89%) quanto silvestre (4,54%). Estudo realizado com ambas as espécies também observou que *Ny. neivai* apresentou uma taxa de infecção maior que *Ny. intermedia*⁴¹. Possivelmente *Ny. neivai* seja uma espécie mais suscetível ao desenvolvimento das leishmânias, o resultados negativos das infecções dos espécimes de *Ny. neivai* de Iporanga podem estar relacionado ao número baixo de espécimes expostos.

Taxas de infecção maiores para espécimes silvestres do que para colonizados também foram observados por Silva e Gomes⁴⁹. Todavia, estes autores observaram taxas de infecção de cerca de 70%.

A baixa infecção observada pode estar relacionada ao animal utilizado como fonte sanguínea. Em estudos com *Ny. whitmani* alimentados em três cães infectados com *Leishmania braziliensis*, verificou-se proporções da infecção diferentes para cada um deles (1,8, 7,1 e 8,3%)⁷⁵. Os hamsters infectados podem ter desenvolvido uma parasitemia maior ou menor dependendo do seu sistema imune o que pode ter dificultado a infecção dos flebotomíneos. Outra explicação para os baixos números de infecção observados, em especial para *Ny. intermedia*, pode ser a temperatura que as fêmeas ingurgitadas foram mantidas. Segundo Hlavacova et al⁴⁵ o desenvolvimento da *L. braziliensis* no flebotomíneo seria acelerado em temperaturas de 26°, especialmente nos primeiros dias após a alimentação.

Não foi observado em ambas as espécies, a sobrevivência após repasto infectante de fêmeas quando mantidas individualizadas. Quando mantidas em gaiola de nylon, *Ny. intermedia* apresentou 34,5% de sobrevivência por 3 ou mais dias, já as da espécie *Ny. neivai* provenientes de colônia de Araraquara mantidas juntas em gaiola semelhante à temperatura de 27°C e umidade de

80% tiveram uma sobrevivência de 85,7% de três dias ou mais, com 10,7% sobrevivendo por 10 dias. Período este muito parecido ao encontrado por Casanova et al⁷⁶, em estudos em campo, que observaram para esta espécie uma sobrevivência de 11 dias para as fêmeas. A sobrevivência de *Ny. neivai* apesar de menor que o encontrado por Diniz et al⁴¹ foi o necessário para a realização de uma segunda tentativa de repasto.

6.4 COMPÊTENCIA VETORA

No presente estudo, a manutenção das fêmeas em potes individualizados parece ter exercido influência na alta mortalidade, pois nenhuma fêmea assim mantida sobreviveu à oviposição. Experimentos sobre competência vetora necessitam que as fêmeas sobrevivam após realizarem a postura e busquem um novo repasto sanguíneo. No entanto, a maior parte das fêmeas não sobrevive à oviposição²⁹. Diniz et al⁴¹ observaram 7% de sobrevivência individualizando as fêmeas.

As tentativas de demonstrar a competência vetora para *Ny. intermedia* não foram bem sucedidas. Apesar de conseguirmos infectar fêmeas desta espécie, tanto silvestre quanto colonizadas, somente 10 delas sobreviveram ao período de 3 dias ou mais e/ou fizeram postura, mas nenhuma se alimentou quando foram desafiadas a um hamster limpo. Também não apresentaram flagelados quando dissecadas.

Apesar do resultado positivo para *Ny. neivai*, a quantidade de espécimes que realizaram uma segunda infecção foi baixa. Silva e Gomes⁴⁹ sugerem que neste tipo de estudo fatores como a artificialidade do laboratório e ausência de elementos químicos e físicos que estimulam o repasto sanguíneo podem agir como barreiras ao sucesso neste tipo de experimento. Além disso, os caiomônios provenientes das fontes sanguíneas também exercem este papel estimulante, como o caso do octenol, encontrado em bovinos, ruminantes e humanos⁷⁷.

A positividade da infecção por leishmânia em amostras do hamster exposto a *Ny. neivai* infectada é um dado inédito e demonstra a competência vetora deste flebótomo para a transmissão de *Leishmania braziliensis*. Os resultados deste estudo reforçam o ponto de vista de Diniz et al⁴¹ que por

meio de infecções experimentais mostraram que *Ny. neivai* seria uma espécie mais propensa a atuar na disseminação das leishmaniose do que *Ny. intermedia*.

7 CONCLUSÃO

a) *Nyssomyia intermedia* e *Ny. neivai* apresentaram formas promastigotas no tubo digestório, corroborando com dados da literatura que observaram o desenvolvimento das leishmanias nestas espécies.

b) A manutenção das fêmeas ingurgitadas juntas em gaiolas de nylon com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de cerca de 80% mostrou-se mais eficiente para obtenção de fêmeas viáveis para um repasto sanguíneo sucessivo ao repasto infectante.

c) Apesar de amplamente utilizado, o uso do papel de filtro nos frascos não influencia na oviposição.

d) *Ny. neivai* demonstrou ser uma espécie competente, ou seja transmitiu *L. braziliensis* a vertebrados.

REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. Leishmaniasis. Magnitude of the problem. Geneva: WHO; 2015 [cited 2015 Dec 25]. Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.htm
- 2 Pimenta PF, Freitas VC, Secundino NF. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: Termignoni C, Masuda H, Neto M, Silva AC, editores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Rio de Janeiro; 2013 [citado 2015 Nov 20] Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-12-a-interacao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores/view>.
- 3 Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. London: Arnold; 2005. p. 313-49.
- 4 Brazil RP, Rodrigues AA, Filho JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. Entomol Ornithol Herpetol. 2015; 4:144.
- 5 Gontijo B, Carvalho ML. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1): 71-80.
- 6 Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
- 7 Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. Microbiology and Microbial infections, Parasitology, London, Sydney, Auckland. 2005; p.313-49.
- 8 Rangel EF, Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In Range EF, Lainson R editors. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003; p. 368
- 9 Pimenta PF, Secundino NF, Blanco EE. Interação vetor hospedeiro. In Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003; p 368

- 10 Foratiini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Editora Edgard Blucher e Ed da Universidade de São Paulo; 1973.
- 11 Organización Mundial de la salud. Luchas contra las Leishmaniasis: Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra:OMS. 1990.
- 12 Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. Braz J Otorhinolaryngol. 2007;73(6):843-7.
- 13 Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação- Sinan Net; 2014. [citado 2014 Fev 08] Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabnet.def>
- 14 Tolezano, JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(3):427-34.
- 15 Schubach TM, Figueredo FB, Okamoto T, Barbieri I, Pereira AS, Cuzzi-Maya T, et al. Leishmaniose tegumentar americana em gatos doméstico (*Felis catus*) naturalmente infectado no Rio de Janeiro-Relato de isolamento de *Leishmania* sp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):342.
- 16 Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The feeding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalps* naturally infected by *Leishmania* spp in a cutaneous and canine leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Vet Parasitol. 2009;160(12):18-24,
- 17 Shapiro JT, Lima Jr MS, Dorval ME, França AO, Matos MF, Bordignon MO. First record for *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. Acta Trop. 2013;128(1):171-74
- 18 Forattini OP, Pattoli DB, Rabello EX, Ferreira AO. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1972;6(3):255-61.

- 19 Taniguchi HH. Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp no ambiente enzoótico florestal de diferentes regiões do Estado de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2010.
- 20 Barbosa GM, Marzochi MC, Massard CL, Lima GP, Confort EM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães no município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saúde Pública. 1999;15(3): 641-46.
- 21 Aguiar GM, Soucasaux T. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. 1 Frequencia mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotomine). Mem inst Oswaldo Cruz. 1984;79(2):197-209.
- 22 Aguiar GM, Vilela ML, Ferreira VA, Santos TG. Ecologia dos flebotomíneos em um recente foco ativo de leishmaniose tegumentar no norte do estado do Paraná (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84 supl. IV, 7-9.
- 23 Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimald Jr G, Sessa PA, Carias VR, et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(2): 155-163.
- 24 Falqueto A, Sessa PA, Varejão JB, Barros GC, Momen H, Grimald Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in espírito santo state, Brasil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86(4):499-500
- 25 Cunha JC, Lima JW, Pompeu MM. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina durante uma epidemia na Serra de Baturité no estado do Ceará, Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2006;9(4):425-35.
- 26 Barretto MP. Contribuição para o estudo da biologia dos flebotomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1942.
- 27 Sherlock IA. Importância médico veterinária. In EF Rangel and R Laison editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.15-19.

- 28 Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: Myler P, Fasel N, editors. *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk. 2008. p. 205-38.
- 29 Brazil RP, Brazil BG. Bionomia: Biologia de Flebotomíneos Neotropical. In Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 257-74.
- 30 Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2004;(1):71–80.
- 31 Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol*. 2011;36(1):1-9.
- 32 Dolgall AM, Alexander B, Holt CD, Harris T, Sultan AH, Bates PA, et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*. 2011;41(5):571–79.
- 33 Campos JH, Costa FA. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo*. 2014;56(4):297-300.
- 34 Coelho WM, Bresciani KDS. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of the species *Tabanus importunes*. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal*. 2013;22(4): 605-07.
- 35 Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends parasitol*. 2006;22(9):439-45.
- 36 Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1097-106.
- 37 Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5: 276.
- 38 Maroli M, Feliciangeli MD, Bichau L, Charre RN, Grado L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013; 27:123-147.

- 39 Galati EA. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos. 2016 [citado 2017 Jan 11] Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>
- 40 Cabrera OI, Munsterman LE, Cardenas R, Gutiérrez R, Ferro C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of leishmania DNA with PCR in phlebotomine flies. Biomedica. 2002; 22 (3):296-302.
- 41 Diniz MM, Galvis FO, Gomes CM, Lavitschka CO, Galati EA. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. Parasit Vectors. 2014;7:139.
- 42 Pimenta PF, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Natl Acad Sci USA.1994;91:9155-59
- 43 Tesh RB, Modi GB. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. Am J Trop Med Hyg. 1984; 33(1):41-46.
- 44 Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 2000;37(1):134-40.
- 45 Hlavacova J, Votypka J, Volf P. The Effect of Temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Development in Sand Flies. J Med Entomol. 2013; 50(5):955-8.
- 46 Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol.1990;4 (1)1-24.
- 47 Sacks DL, Kamhawi S. molecular aspects of parasite vector and vector-host interactions in the leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453-83
- 48 Ready PD. Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol. 2013; 58: 227-50.

- 49 Silva AC, Gomes AC. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(2):187-91.
- 50 Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the rôle of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis* in the Serra dos Carajas. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1987;81:353-9.
- 51 Beach R, Kiilu G, Hendricks L, Oster C, Leeuwenburg J. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1984;78:747-51.
- 52 Oliveira EF. Capacidade vetorial para *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* para *Leishmania (Leishmania) infantum*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2015.
- 53 Marcondes CB. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and Resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;1: 457-62.
- 54 Andrade-Filho JD, Galati EA, Falcao AL. 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.
- 55 Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(1): 51-8.
- 56 Andrade-Filho JD, Galati EA, Falcao AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(4):481-7.
- 57 Forattini OP, Pattoli DB, Rabello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Ver Saúde Pública. 1972;6:431-33.

- 58 Forattini PO, Rabello EX, Serra OP, Cotrim DM, Galati EA, Barata JM. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1976;10:31-43.
- 59 Aragão HB, Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Bras Med* 1922;36:129-30.
- 60 Rangel EF, Souza N, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79 (3):395-6.
- 61 Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Sousa NA, Wermelinger ED. 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(2):235-8.
- 62 Shimabukuro PH, Galati EA. Lista de espécies de Phlebotominae, (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2011;11(1):1-20.
- 63 Santos DR, Santos AR, Poiani LP, Oliveira O, Silva AM, Galati EA. Ocorrência de *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neivai) (Diptera Psychodidae) e fauna associada no Paraná. *Neotrop Entomol*. 2009;38(2): 298-301.
- 64 Dias-Sversutti AC, Scodro RL, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Estudo Preliminar da Preferência Alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em Área Rural do Paraná. *Neotrop Entomol*. 2007;36(6):953-9.
- 65 Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcao AL, et al. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46(5):1159-63.
- 66 Pita-Pereira D, Souza DG, Zwestsch CRA, Britto C, Rangel EF. Short report: First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban área of South Brazil using multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(4):595-95.

- 67 Neitzke-Abreu HC, Reinhold-Castro KR, Venazzi MS, Scodro RB, Dias AC, Silveira TGV, et al. Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2014; 56(5): 391-95.
- 68 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One*. 2012;7(5):12.
- 69 Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana Casos Confirmados segundo GVE e Município de Infecção e Ano de Diagnóstico no Estado de São Paulo de 2007 a 2016. Ministério da Saúde do estado de São Paulo; 2017. [Citado em: 2017 Jan 07] Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/lta/lta_gve_muninfec.pdf
- 70 Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Cristaldo G, Rocha HC, Gonçalves-Andrade RM, et al. Attraction of black Shannon Trap for Phlebotomines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(5): 641-7.
- 71 Killick-Kendrick M, Killick-Kendrick R, The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia*. 1991; 33(1):315-20.
- 72 Ovallos FG. Estudo da capacidade vetorial de *Migonomya migonei* (França) e *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha e Chagas. [dissertação] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo;2011.
- 73 Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2006;137(3-4):214-21.
- 74 Goulart TM, Castro CF, Machado VE, Silva FB, Pinto MC. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). *Parasit Vectors*. 2015;8(1):423.
- 75 Vexenat AJ, Barretto AC, Rosa AC. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81(1):125-6.

- 76 Casanova C, Costa AI, Natal D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(7): 719-24.
- 77 Pinto MC, Barbieri K, Silva MC, Graminha EMAS, Casanova C, Andrade AJ, et al. Octenol as Attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Field. J Med Entomol. 2011;48(1)39-44.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 05 de Junho de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Mauro Toledo Marreli
(aos cuidados de Cecilia de O lavitschka)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade 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 **CPE-IMT/000279A 'Competência vetora de Nyssomyia intermedia e Nyssomyia neivai para Leishmania (Viannia) braziliensis'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Mellores Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP