

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Nyssomyia whitmani*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) PARA
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Magda Freitas Fernandes

Dourados-MS
Abril de 2014

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Magda Freitas Fernandes

**COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Nyssomyia whitmani*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) PARA
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Eunice Aparecida Bianchi Galati

Co-Orientadora: Alessandra Gutierrez de Oliveira

Dourados-MS

Abril de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD

Fernandes, Magda Freitas.

Competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Magda Freitas Fernandes – Dourados, MS: UFGD, 2014.

111f.

Orientadora: Profa. Eunice Aparecida Bianchi Galati.

Co-Orientadora: Profa. Alessandra Gutierrez de Oliveira.

Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

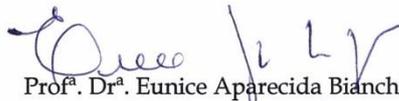
1. Flebotomíneos. 2. Leishmaniose Tegumentar. 3. Leishmânias. I. Competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

“Competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae) para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”

Por

MAGDA FREITAS FERNANDES

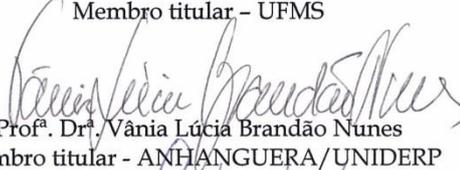
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Prof^a. Dr^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati
Orientadora - USP



Prof^a. Dr^a. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval
Membro titular - UFMS



Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia Brandão Nunes
Membro titular - ANHANGUERA/UNIDERP



Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Membro titular - UFGD



Prof. Dr. Jairo Campos Gaona
Membro titular - UFGD

Aprovada em: 12 de abril de 2014.

BIOGRAFIA DO ACADÊMICO

Magda Freitas Fernandes, natural de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, nascida em 11 de janeiro de 1966. Filha de Josué de Souza Fernandes e Zoé Freitas Fernandes. Coursou o ensino fundamental nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Em Dourados, MS concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Menodora Fialho de Figueiredo e o ensino médio na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Presidente Vargas. Graduada em Ciências Biológicas, Licenciatura Plena (1993-1996) e Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (2002-2004) pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), *Campus* de Dourados. No ano de 2010 iniciou o Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho somente foi possível graças à participação e colaboração de muitos. Cada um, a seu modo, contribuiu para a sua concretização. A eles meu reconhecimento:

Ao Deus Altíssimo, Senhor, Criador e Mantenedor da Vida, toda Honra e Glória!

A minha orientadora, professora Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, Faculdade de Saúde Pública (FSP), USP, exemplo de profissionalismo e dedicação, por confiar em meu trabalho e pela oportunidade de compartilhar seus ensinamentos. Minha admiração e muito obrigada pela confiança, amizade e estímulo desde o início da pesquisa.

A minha co-orientadora, professora Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira, Laboratório de Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS pela confiança, amizade e à equipe de seu laboratório que sempre me recebeu com muito carinho e disposição para ajudar. Pelos recursos financeiros para a análise molecular da fauna flebotomínea dos 10 fragmentos de mata na área urbana de Dourados-MS.

A Elisa Teruya Oshiro, médica veterinária, CCBS, UFMS pelos constantes tira-dúvidas e pelas conversas sempre engrandecedoras, que sempre me recebeu de braços abertos, hospedando-me em Campo Grande. Por se responsabilizar pela cultura das cepas de *Leishmania* e pelas inoculações dos hamsters para a realização dos experimentos de competência vetorial. Obrigada pela atenção, apoio e carinho.

A professora Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, Laboratório de Análises Clínicas, CCBS, UFMS, pelos ensinamentos, paciência e incansável disposição de toda a sua equipe durante todo o trabalho de leitura dos *imprints* em lâmina das amostras de baço dos hamsters e, o cultivo dessas amostras. Obrigada pela amizade, pelo apoio e por estar sempre disposta a ajudar.

A professora Dra. Vânia Lúcia Brandão Nunes, aposentada da UFMS e docente na Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS, pelos ensinamentos e estímulo, amizade, paciência e por estar sempre disposta a hospedar-me e a toda equipe de pesquisa com flebotomíneos de Dourados. Obrigada pela doação de materiais de consumo, aspiradores elétricos, gaiolas de hamsters, dentre outros. Obrigada pela atenção, apoio e carinho e aos valiosos conselhos.

A Geucira Cristaldo (UFMS), que mesmo aposentada, com sua experiência, sempre atendeu ao meu apelo para dirimir as dúvidas em relação à criação em laboratório de flebotomíneos. Obrigada pela sua dedicação e amizade.

Ao professor Dr Fábio Juliano Negrão da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), UFGD por me ensinar a anestésiar os hamsters, na verdade a perder o medo de anestesiá-los; pela realização das inoculações e necrópsias dos animais e pela realização da PCR para detectar o parasita *Leishmania* nos animais eutanasiados para confirmação de competência vetorial da espécie de flebotomíneo estudada. Obrigada pela colaboração, ajuda e reconhecimento da importância do desenvolvimento deste projeto! Muito obrigada!

Ao professor Dr. José Dilermando Andrade Filho, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR, Fiocruz), Minas Gerais, pelo envio das cepas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

A Bióloga MSc. Cassiana Miki Ishimi que conjuntamente fizemos o levantamento da fauna flebotomínea e a investigação de infecção natural por flagelados do gênero *Leishmania* e serviu para a sua dissertação de mestrado.

Ao professor Dr. José Benedito Balestieri por disponibilizar o espaço do seu laboratório de pesquisa com abelhas nativas e, ainda permitir-me reformá-lo com a infraestrutura necessária para o desenvolvimento das pesquisas e imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Aos professores Dr. Eduardo José de Arruda (UFGD) e ao Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha (UFMS) por disponibilizarem recursos financeiros para equiparmos o laboratório.

A Pró-Reitoria de Administração da UFGD por custear parte da reforma, o biotério para insetos vetores, instalação dos equipamentos adquiridos pelos recursos de outros pesquisadores, dentre outros.

Aos amigos, Kleiton Maciel dos Santos e Marines Stefaneli, que lá pelo ano de 2012, durante dois meses, limpamos, lixamos, lavamos e pintamos 54m² do laboratório de pesquisa da pós-graduação da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), UFGD. Espaço este cedido pelo professor Dr. José Benedito Balestieri para que pudéssemos montar a sala de criação de flebotomíneos, a sala de preparo e microscopia e o biotério. Sem esse espaço e sem a reforma eu não teria concretizado a presente pesquisa. Muito obrigada, meus amigos, porque foram muitas horas de trabalho, mas também nos divertimos muito, com as animadas conversas. Não tenho palavras para agradecer.

A Ana Paula Silva Levay Triches e ao seu esposo Rodrigo Júnior Triches por ajudar nos retoques finais da reforma do laboratório de criação, por estarem sempre presentes e

dispostos e pela colaboração. Pelas pizzas que levaram quando eu e o Kleiton estávamos trabalhando até de madrugada. Obrigada também por me ajudarem a segurar os hamsters para anestesiá-los, porque eu tinha muito medo de machucá-los e ainda continuo tendo, mas consegui no final, anestesiá-los sozinha, com ajuda é claro das dicas do professor Fábio Juliano Negrão.

Ainda aos amigos Kleiton e Ana Paula, que desde o início anestesiaram os hamsters para a realização dos experimentos em laboratório. Ao Kleiton, por estar sempre presente nas coletas de campo, na mata Coqueiro (Azulão) para captura de flebotomíneos vivos para estabelecimento da colônia. Por passar muitas madrugadas comigo no laboratório, ajudando-me a individualizar as fêmeas de flebotomíneos, dissecar e identificar e nas intermináveis experimentações! A Ana Paula por cuidar para que eu não perdesse as amostras biológicas de pacientes suspeitos de leishmaniose visceral e tegumentar, que passaram pelo HU-Hospital Universitário da UFGD para que fosse possível identificarmos a espécie de *Leishmania* circulante em Dourados. Aos dois pela amizade, alegria e inestimável colaboração nos trabalhos de campo e laboratório.

A minha prima Mariangela Freitas da Silva Moraes, a 'Mari' que muitas vezes ajudou nas coletas de flebotomíneos na mata; também levando alimento para mim no laboratório. Por me socorrer quando o meu carro, o 'flebomóvel' não queria sair do lugar.

E também à minha tia Zenir Freitas da Silva, que muitas vezes foi com a Mari socorrer-me e pelo apoio financeiro quando precisei. Pelo colo, pela palavra, pelo silêncio, pela alegria, mas principalmente pela amizade.

A tia Generoza Cortez de Lucena, pelo apoio financeiro, principalmente, nos meses finais de conclusão da tese, por estar sempre disposta a me ajudar nas horas mais difíceis. Obrigada pela sua ajuda, incentivo e carinho.

Ao tio Ajurycaba Cortez de Lucena, pelo seu incentivo e apoio financeiro no início deste projeto de doutorado.

As minhas amigas de longa data com quem sempre posso contar: Débora Held, Elda Borges, Rute Baptista e Mariúcia Bezerra, sempre amigas. Obrigada pela torcida, carinho e amizade.

Aos meus irmãos Marcelo Freitas Fernandes, Ricardo Freitas Fernandes e Regina Célia Freitas Fernandes e aos nove sobrinhos, mesmo tendo vocês tão distantes, adoro vocês!

Em especial a cinco pessoas que me deram apoio, força e incentivo e recursos financeiros para a reforma do laboratório de insetos vetores, o LIVE e a aquisição de equipamentos imprescindíveis para a realização desta pesquisa, Dr Rivaldo Venâncio da

Cunha (UFMS), Dr Eduardo José de Arruda, Dr Jairo Campos Gaona, Dr Wedson Desidério Fernandes e Dr Fábio Juliano Negrão (UFGD).

A Divisão de Transportes da UFGD, na pessoa do senhor Carlos Paulino Ramos pelo apoio logístico dispensado à pesquisa e pela cordialidade e receptividade da equipe de motoristas.

A toda equipe do Setor de Manutenção da UFGD, principalmente, ao José Carlos Nogueira que me aguentou toda vez que algo quebrava no laboratório, ou estourava algum cano e recorria a ele por telefone. Maravilhoso celular...

E ao professor Dr. Sidnei Azevedo da Pró-Reitoria de Administração (PRAD) da UFGD, pela ajuda e colaboração, sem restrições e, pela sua valiosa paciência procurando resolver os problemas sempre constantes de queda de energia na Universidade. Obrigada pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho!

A todos os anjos que apareceram na minha vida ao longo dessa difícil jornada. Amo vocês!

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais
Josué de Souza Fernandes e Zoé Freitas
Fernandes *in memoriam*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xx
CAPÍTULO 1	xxi
COMPETÊNCIA VETORIAL DE <i>Nyssomyia whitmani</i> (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) PARA <i>Leishmania (Leishmania)</i> <i>amazonensis</i>	xxi
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	3
2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS FLEBOTOMÍNEOS.....	5
2.3 BIOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS	8
2.3.1 ALIMENTAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS	9
2.4 INTERAÇÃO <i>LEISHMANIA</i> -VETOR.....	10
2.5 REQUISITOS DE INCRIMINAÇÃO VETORIAL.....	11
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 OBJETIVO GERAL	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4 HIPÓTESE	14
5 MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	15
5.2 LOCAL E PERÍODO DE COLETA	16
5.3 METODOLOGIA DE COLETA	16

5.4 OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) DE FLEBOTOMÍNEOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	20
5.5 REMOÇÃO E TRANSFERÊNCIA DOS OVOS DE FLEBOTOMÍNEOS	24
5.6 ALIMENTAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DAS FORMAS IMATURAS	26
5.7 DISSECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE FORMAS FLAGELADAS EM FÊMEAS SELVAGENS.....	29
5.8 CEPA DE <i>L. (L.) amazonensis</i> UTILIZADA PARA AS EXPERIMENTAÇÕES	30
5.9 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	30
5.10 METODOLOGIA DE REPASTO INFECTIVO E REPASTO SANGUÍNEO EM HAMSTERS SUSCETÍVEIS.....	30
5.11 TESTES DE SUSCETIBILIDADE DE <i>Ny. whitmani</i> F1 PARA <i>L. (L.) amazonensis</i> E DE TRANSMISSÃO VIA PICADA	32
5.12 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE BAÇO DOS HAMSTERS SUSCETÍVEIS	37
5.12.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	37
5.12.2 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	38
5.12.3 INCUBAÇÃO COM Hae III	38
5.13 ANÁLISE MOLECULAR DAS FÊMEAS DE <i>Ny. whitmani</i> F1.....	38
5.13.1 EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>LEISHMANIA</i>	39
5.13.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	39
5.13.3 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	39
5.13.4 INCUBAÇÃO COM Hae III	40
6 RESULTADOS	41
6.1 EXPERIMENTO 1 - Exposição de <i>Ny. whitmani</i> F1 à hamster experimentalmente infectado e teste de transmissão via picada à hamsters suscetíveis.....	41

6.2 EXPERIMENTO 2 - Exposição de <i>Ny. whitmani</i> F1 à hamster experimentalmente infectado e teste de transmissão via picada à hamsters suscetíveis.....	41
6.3 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE BAÇO DOS HAMSTERS PELA PCR-RFLP.....	42
7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÕES.....	44
9 REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO 1 – PROTOCOLO N° 001/2013 - CEUA/UFGD.....	58
CAPÍTULO 2.....	59
Manuscrito 1: Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em fragmentos de mata em área urbana e infecção natural de <i>Nyssomyia whitmani</i> por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	59
RESUMO.....	61
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
ÁREA DE ESTUDO.....	62
PERÍODO ESTUDADO.....	63
PESQUISA ENTOMOLÓGICA.....	63
INFECÇÃO NATURAL.....	64
PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	65
RESULTADOS.....	65
FAUNA FLEBOTOMÍNEA.....	65
INFECÇÃO NATURAL.....	70
DISCUSSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
CAPÍTULO 3.....	76
Manuscrito 2. Primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral: sequenciamento molecular.....	76

RESUMO	78
INTRODUÇÃO	78
MÉTODOS.....	79
RESULTADO	79
DISCUSSÃO.....	80
AGRADECIMENTOS.....	81
REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO 4.....	82
Manuscrito 3. Remoção e transferência de ovos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) para estabelecimento de sua progênie em laboratório.....	82
RESUMO	84
INTRODUÇÃO	84
MATERIAL E MÉTODOS	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Nyssomyia whitmani* (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) PARA *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Figura 1. Ponto de coleta de flebotomíneos selvagens, fragmento de mata Fazenda Coqueiro (M1P1), no município de Dourados-MS. Material produzido a partir das imagens do satélite Landsat-8.....15

Figura 2. Detalhes do fragmento de mata Fazenda Coqueiro, município de Dourados-MS. (A) e (B) Vista geral do fragmento de mata. (C) Entrada do fragmento de mata e (D) Trilha de acesso ao ponto de coleta de flebotomíneos selvagens.....16

Figura 3. (A) Armadilha de Shannon Preta. (B) Armadilha de Shannon Branca.....17

Figura 4. Espécime selvagem macho de *Ny. whitmani*.....18

Figura 5. Espécime selvagem fêmea de *Ny. whitmani*.....18

Figura 6. Aspirador elétrico para coleta de espécimes selvagens vivos de flebotomíneos para estabelecimento de colônia de *Ny. whitmani* em laboratório.....19

Figura 7. Gaiolas de criação com espécimes vivos de flebotomíneos, acondicionadas em caixa de isopor revestida internamente com gesso pedra creme.....20

Figura 8. (A) Fêmea selvagem de flebotomíneo individualizada para postura dos ovos. (B) Fêmea de *Ny. whitmani* ovipondo no substrato (gesso). (C) Genitália de fêmea de *Ny. whitmani*. Detalhe seta: par de espermatecas. (D) Ovos de *Ny. whitmani*.....21

Figura 9. (A) Tubo de polietileno de tampa plástica com um furo em seu meio. (B-1) Placa de cultivo modelo 1, seta mostrando borda superior com encaixe que se ajusta perfeitamente à tampa. (C) Placa de cultivo modelo 2 - encaixe não ocorre na borda superior. (D) D-1 Coloração do gesso pedra creme quando umedecido.....22

Figura 10. (A) Tubos com fêmeas individualizadas e pedacinhos de maçã sob a tela como fonte de carboidrato para as fêmeas. (B) Formas imaturas em placas de cultivo. (C) Tubos com fêmeas individualizadas e placas de cultivo com formas imaturas mantidos em caixas de isopor.....24

Figura 11. (A) Pincel para deslocar o ovo do substrato (gesso). (B) Tubo foi invertido e batendo-se com um pinça externamente, no fundo do tubo, os ovos caem sobre a camada de gesso. (C) Ovos sobre a camada de gesso umedecido na placa de cultivo. (D) Placa de cultivo com 4º estágio larval (L4) de *Ny. whitmani*.....26

Figura 12. Formas imaturas de *Ny. whitmani*. Ovos; 1º estágio (L1); 2º estágio (L2) e 3º estágio (L3).....28

- Figura 13.** Formas imaturas de *Ny. whitmani*. 4º estágio (L4); pupa e adultos (emergência).....28
- Figura 14.** (A) Gaiolas com hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* com tela de tecido de voil para proteção. (B) e (C) Detalhe do local de inoculação de *L. (L.) amazonensis*, coxim plantar de uma das pernas.....31
- Figura 15.** (A) Fêmeas de *Ny. whitmani* (F1) ingurgitadas do repasto infectivo. (B) Fêmeas ingurgitadas retiradas com capturador de castro. (D) Pote com fêmeas ingurgitadas para dissecação.....32
- Figura 16.** Desenho esquemático da metodologia utilizada conforme a emergência dos espécimes vivos de *Ny. whitmani* F1; das fêmeas ingurgitadas no repasto infectivo e o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis – **Experimento 1**.....34
- Figura 17.** Desenho esquemático da metodologia utilizada conforme a emergência dos espécimes vivos de *Ny. whitmani* F1; das fêmeas ingurgitadas no repasto infectivo e o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis – **Experimento 2**.....36
- Figura 18.** Amplificação da região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal ITS1 (SSU rRNA e 5.8S rRNA) de *L. (L.) amazonensis*. 1ª coluna: **marcador de 100 pb. Hamsters de 1 a 19; 30 e 31:** do experimento 2. **Hamsters de 20 a 25:** do experimento 1. **Controle positivo (29):** hamster infectado experimentalmente por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa R24.....42

CAPÍTULO 2. Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em fragmentos de mata em área urbana e infecção natural de *Nyssomyia whitmani* por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Figura 1. Área urbana do município de Dourados. Pontos de coleta de flebotomíneos, fragmentos de matas inseridas dentro do raio de 500 metros. Material produzido a partir das imagens do satélite CBERS 2B, sensor CCD, órbitas ponto 136/125, com o emprego das bandas 2, 3 e 4, datada de 21 de abril de 2009; e sensor HRC, órbitas ponto 163D_125, data de 07 de janeiro de 2009, com o uso do Programa *Spring*.....64

Figura 2. Distribuição mensal das espécies *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai*. **A.** Médias mensais de umidade relativa do ar (%). **B.** Número total de indivíduos com as médias mensais de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), no período de novembro de 2010 a novembro de 2011....70

Figura 3. Distribuição mensal da espécie *Lu. longipalpis*. **A.** Médias mensais de umidade relativa do ar (%). **B.** Número total de indivíduos com as médias mensais de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), no período de novembro de 2010 a novembro de 2011.....71

Figura 4. Resultado da amplificação pela PCR – oligonucleotídeos LITSR e L5.8S de *Ny. whitmani* (amostra individualizada) com infecção natural por *Leishmania spp*.....72

Figura 5. Digestão das regiões amplificadas ITS1 da espécie de *L. (L.) infantum* com endonuclease de restrição HAE III de diferentes espécies de flebotomíneos.....73

CAPÍTULO 3. Primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral: sequenciamento molecular

Figura 1. Produtos amplificados pela técnica de PCR seguida de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição ITS 1 (RFLP) com a enzima Hae III.

Linha 1. Marcador molecular de 100 pb; **2.** Agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum* caso 1; **3.** Padrão de restrição caso 1; **4.** Agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum* caso 2; **5.** Padrão de restrição do caso 2; **6.** Controle negativo.....81

CAPÍTULO 4. Remoção e transferência de ovos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) para estabelecimento de sua progênie em laboratório

Figura 1. (A) Pincel para deslocar o ovo do substrato (gesso). (B) Tubo foi invertido e batendo-se com um pinça externamente, no fundo do tubo, os ovos caem sobre a camada de gesso. (C) Ovos sobre a camada de gesso umedecido na placa de cultivo. (D) Placa de cultivo ovos de *Ny. whitmani*.....86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em fragmentos de mata em área urbana e infecção natural de *Nyssomyia whitmani* por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Tabela 1. Número absoluto, índice de abundância de espécies padronizado (IAEP) e frequência relativa de flebotomíneos em ambiente de mata, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011, em área urbana do município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.....68

Tabela 2. Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011.....69

CAPÍTULO 1

COMPETÊNCIA VETORIAL DE *Nyssomyia whitmani* (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) PARA *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

RESUMO

Achados de espécies de flebotomíneos com infecção natural por *Leishmania* spp. e ainda não implicadas na transmissão de determinados agentes de leishmanioses, suscita a necessidade de se investigar a sua competência. No estado de Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, casos humanos de leishmaniose tegumentar tem sido atribuídos a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Nyssomyia whitmani* tem sido uma das espécies antropofílicas mais frequentes em áreas de matas. Este estudo teve como objetivo investigar a suscetibilidade experimental de *Ny. whitmani* para *L. (L.) amazonensis* e a sua transmissão para hamsters não infectados (suscetíveis). As coletas de espécimes selvagens de flebotomíneos foram realizadas em fragmento de mata no município de Dourados, MS com armadilha de Shannon Preta e Branca, modificadas, com o auxílio de aspiradores elétricos, em período noturno. Machos e fêmeas foram mantidos em gaiolas de criação para o acasalamento e o repasto sanguíneo foi feito em hamsters suscetíveis expostos às picadas por duas horas. Após 48 horas, as fêmeas ingurgitadas foram individualizadas em tubos de polietileno para a postura dos ovos os quais foram transferidos para placas de cultivo até à emergência dos espécimes adultos. Os testes de suscetibilidade com fêmeas *Ny. whitmani* F1, foram realizados em duas etapas: No 1º experimento emergiram 145 espécimes em um período médio de 55 dias. Das 83 fêmeas, 57 (68,67%) fizeram o repasto infectivo. Destas, 21 (36,84%) fizeram o 2º repasto em hamster suscetível: 12 (57,14%) no 5º dia; cinco (23,81%) no 6º dia; duas (9,52%) no 12º dia e duas (9,52%) no 21º dia. No 2º experimento emergiram 911 espécimes. 313 fêmeas fizeram o repasto infectivo e 134 (42,81%) o 2º repasto em hamster suscetível: 13 (9,70%) no 6º dia; 82 (61,19%) no 7º dia; nove (6,72%) no 8º dia; 19 (14,18%) no 9º dia; seis (4,48%) no 10º dia; três (2,24%) no 12º dia e duas (1,49%) no 14º dia. No total, 27 hamsters suscetíveis foram expostos às picadas de fêmeas de *Ny. whitmani* que se alimentaram de hamsters infectados. A confirmação da infecção por *L. (L.)*

amazonensis nos hamsters desafiados no 2º repasto foi realizada a PCR-RFLP para amplificação de um fragmento de 100 pb do minicírculo de kDNA das amostras de baço dos hamsters, utilizando a enzima de restrição Hae III. A positividade foi de 100%. Uma vez que experimentalmente *Ny. whitmani* infectou-se por *L. (L.) amazonensis*, e conseguiu transmitir a infecção para hamsters suscetíveis, a sua competência vetorial para este parasita foi demonstrada. Todavia, estudos sobre a sua capacidade vetorial em relação à transmissão de *L. (L.) amazonensis* necessita ser avaliada.

Palavras-Chave: Flebotomíneos, Leishmaniose tegumentar, Incriminação vetorial.

**VECTOR COMPETENCE OF *Nyssomyia whitmani* (DIPTERA: PSYCHODIDAE:
PHLEBOTOMINAE) TO *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

ABSTRACT

Findings of phlebotomine species naturally infected by *Leishmania* spp., and not yet implicated in the transmission of particular leishmaniasis agents, bring out the need to investigate those species' vectorial competence. In Mato Grosso do Sul state (MS), Brazil human cases of cutaneous leishmaniasis have been attributed to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Nyssomyia whitmani* has been one of the anthropophilic species most frequently found in forested areas. The objective of this study was to investigate the experimental susceptibility of *Ny. whitmani* to *L. (L.) amazonensis* and its transmission to uninfected (susceptible) hamsters. Wild phlebotomine species were captured in a forest fragment in Dourados, MS, during the night period with black and white modified Shannon traps and the use of electrical aspirators. Males and females were kept in cages for mating and the blood meal was taken on susceptible hamsters exposed to biting for two hours. After 48 hours the engorged females were placed in individual polyethylene vials for egg laying. The eggs were then transferred to small Petri dishes until the emergence of the adult specimens. The susceptibility tests with *Ny. whitmani* F1 females were undertaken in two stages: in the first experiment 145 specimens emerged in an average period of 55 days. Of the 83 females, 57 (68.67%) took the blood meal on the infected hamsters. Of those 57, 21 (36.84%) took the second meal on the susceptible hamsters: 12 (57.14%) on the 5th day, 5 (23.81%) on the 6th day, 2 (9.52%) on the 12th day and 2 (9.52%) on the 21st day. In the second experiment 911 specimens emerged in an average period of 58 days. 313 females took the blood meal on the infected hamsters, and 134 (42.81%) the second blood meal on the susceptible hamsters: 13 (9.70%) on the 6th day, 82 (61.19%) on the 7th day, 6 (6.72%) on the 8th day, 19 (14.18%) on the 9th day, 6 (4.48%) on the 10th day, 3 (2.24%) on the 12th day and 2 (1.49%) on the 14th day. A total of 27 susceptible hamsters were exposed to the females which had fed themselves on the infected hamsters. The confirmation of infection by *L. (L.) amazonensis* in the hamsters exposed for the 2nd blood meal was undertaken by Polymerase Chain Reaction to kDNA followed by Restriction Fragment Length Polymorphism Assay with *Hae* III of the samples of the spleen of the hamsters, giving a 100% positive reaction.

Seeing that *Ny. whitmani* was experimentally infected by *L. (L.) amazonensis* and succeeded in transmitting the infection to susceptible hamsters, its vectorial competence for this parasite has thus been demonstrated . However, it is necessary to undertake studies for the assessment of its vectorial capacity in regard to the transmission of *L. (L.) amazonensis*.

Key-Words: Sandflies, Cutaneous leishmaniasis, Vector incrimination.

1 INTRODUÇÃO

Embora se conheçam aspectos epidemiológicos das leishmanioses e o papel dos flebotomíneos na transmissão de várias espécies de *Leishmania* nas Américas, a capacidade vetorial desses insetos suspeitos ou comprovados não tem sido avaliada (CASANOVA *et al.*, 2009). 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 de agentes das leishmanioses (VOLF & MYSKOVA, 2007; MYSKOVA *et al.*, 2007).

Algumas espécies de flebotomíneos não reconhecidas como vetores de *Leishmania* desenvolvem experimentalmente (ROGERS & BATES, 2007; PAIVA *et al.*, 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 & MYSKOVA, 2007; MYSKOVA *et al.*, 2007).

Estudos anteriores realizados em Dourados demonstraram que *Nyssomyia whitmani* foi encontrada infectada naturalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, agente da leishmaniose tegumentar (LT), na aldeia Jaguapiru, área indígena. Na área urbana, no intra e peridomicílios foi detectada a infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente da leishmaniose visceral (LV), em três espécies de flebotomíneos: *Ny. whitmani*, *Psathyromomyia bigeniculata* e *Lutzomyia longipalpis*. Em Belo Horizonte, Minas Gerais, *Ny. whitmani* também foi encontrada naturalmente infectada por *L. (L.) infantum* (SARAIVA *et al.*, 2010).

A espécie *Ny. whitmani* vem sendo encontrada na cidade de Dourados, principalmente em áreas próximas à fragmentos de mata e, possivelmente envolvida na manutenção do ciclo de *Leishmania* spp. entre animais domésticos e humanos.

No município 17 casos de LT foram registrados no período de 2007 a março de 2014; com quatro casos autóctones no mesmo período; destes um na área indígena, aldeia Jaguapiru. Dois casos autóctones de LV em 2012, em 2013 mais dois casos, com um óbito e até março de 2014, um caso (SINAN, 2014a).

Neste sentido, são de particular interesse espécies de flebotomíneos que possam atuar na cadeia de transmissão dos agentes da LT e LV, onde a infecção humana por LT, LV e leishmaniose visceral canina (LVC) se fazem presentes.

Estudos sobre a competência vetorial de uma espécie de flebotomíneo em relação à *Leishmania* spp. apresentam como um dos grandes desafios a obtenção de fêmeas de primeira geração em número suficiente para desenvolver os experimentos. Estes envolvem fêmeas alimentadas em animal experimentalmente infectado pelo parasita, e decorrido o período de incubação extrínseca, desafiá-las a se alimentarem em animais suscetíveis.

Face a isso, se faz necessário esclarecer se a espécie *Ny. whitmani* é suscetível à *L. (L.) amazonensis* e demonstra competência vetorial na transmissão deste parasita.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses tegumentar (LT) e visceral (LV) constituem, dentre as protozooses humanas, um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil onde são consideradas endêmicas, como em grande parte dos Continentes Americano, Asiático, Europeu e Africano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estão entre as seis doenças tropicais; depois da malária, a segunda de maior relevância no mundo; infectando cerca de 14 milhões de pessoas em todo o mundo e 350 milhões vivendo em área de risco. Para a LT a incidência anual é de um a 1,5 milhões de novos casos e 500.000 casos para a forma visceral (WHO, 2014).

No Brasil, casos de LT e LV são assinalados em todos os Estados da Federação (WHO, 2014; BRASIL, 2010), com incidência elevada, em decorrência de mudanças ambientais, resultantes das atividades humanas, com modificação do perfil epidemiológico, tanto em áreas onde a transmissão é florestal, como em focos enzoóticos naturais e em áreas periurbanas, envolvendo reservatórios domésticos que participam da manutenção e transmissão de *Leishmania* (DEANE & GRIMALDI, 1985; SHAW, 2002; BRASIL, 2006, 2010).

As leishmanioses são doenças causadas por espécies de protozoários parasitas pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, que determinam diferentes formas clínicas (LAINSON & SHAW, 2005) com transmissão vetorial. São zoonoses que deixaram de ser primariamente silvestre, de caráter eminentemente rural (FORATTINI, 1973) e vêm se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte. São consideradas doenças emergentes e um problema de saúde pública no Brasil, devido à gravidade da LV e de algumas de suas formas da LT (BRASIL, 2006, 2010) que provocam nas pessoas acometidas incapacidade temporária ou definitiva, bem como mutilações decorrentes das formas mucocutânea e cutânea difusa, que se traduzem por marcantes fenômenos psicossociais e estigmatizantes nos pacientes (COSTA *et al.*, 1987; BARRAL *et al.*, 1991; MARSDEN, 1994).

Atualmente são conhecidas cerca de 30 espécies de *Leishmania* que infectam os animais vertebrados e, que se encontram subdivididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987). Ambos os subgêneros apresentam duas formas

evolutivas, a forma amastigota (aflagelada) e a forma promastigota (flagelada) (LAINSON & SHAW, 1987).

No Brasil, a LT é causada por diferentes espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Existem pelo menos sete espécies descritas e que estão associadas à doença humana. Subdivididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, são elas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw 1972; *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna 1911; *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch 1954; *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa 1987; *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw 1989; *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza & Lainson 2002 e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira *et al.*, 2002 (BRASIL, 2010). Dentre estas, as que têm sido mais frequentemente associadas à infecção no homem, são as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GOMES, 1992; LAINSON *et al.*, 1994). Em relação a LV, *Leishmania (Leishmania) infantum* tem sido associada na maioria dos casos humanos (BRASIL, 2006).

Uma das espécies causadoras da LT no Brasil, responsável pelas formas cutânea, cutâneo-mucosa e cutâneo-difusa é a *L. (L.) amazonensis*, sendo a forma cutâneo-difusa considerada o polo anérgico da LT (BARRAL *et al.*, 1991).

Em relação à LVC, no Brasil, ela coexiste com a doença humana, sendo o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), a principal fonte de infecção de *L. (L.) infantum* para o homem (MORENO e ALVAR, 2002), sobretudo no ciclo urbano da doença. A infecção canina precede a maioria dos casos humanos (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006), promovendo a dispersão da doença para áreas não endêmicas (BRASIL, 2010; PAULA *et al.*, 2009). Sobre o seu papel na cadeia de transmissão, DEANE e GRIMALDI (1985), elucidaram que os fatores que implicavam o cão como reservatório da doença, eram a distribuição coincidente das leishmanioses canina e humana; o frequente encontro de casos humanos e caninos na mesma habitação ou em habitações vizinhas; a prevalência, em geral mais elevada da LVC em relação à humana e à grande suscetibilidade do cão.

Levando-se em consideração que o cão é o principal reservatório de *L. (L.) infantum* e está frequentemente envolvido no ciclo urbano da doença, precedendo a maioria dos casos humanos; LANE *et al.* (1990) e WARD *et al.* (1990), sugerem que os machos de flebotomíneos são atraídos aos hospedeiros para a cópula, que pode ocorrer antes, durante ou após o repasto sanguíneo e, que a agregação de machos pode ser mediada por feromônios (DYE *et al.*, 1991), e presume-se que a chegada inicial dos machos ocorra em resposta à

atratividade exercida pelas substâncias que compõem o suor do hospedeiro (PINTO *et al.*, 2001).

2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (FORATTINI, 1973) e, constituem um grupo de insetos de grande importância na saúde pública, em virtude de suas fêmeas, estarem envolvidas na transmissão de *Leishmania*, agentes das LT e LV. Têm ampla distribuição mundial, sendo mais abundantes na Região Neotropical. Nas Américas são conhecidas aproximadamente 500 espécies (GALATI, 2014) e cerca de 60 delas estão implicadas, suspeitas ou comprovadas, na veiculação de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1990; DEDET, 1993; CIPA GROUP, 1993; SHERLOCK, 2003). No Brasil, foram descritas 284 espécies (GALATI *et al.*, 2003, 2010; GALATI, 2014), sendo 63 delas encontradas para o Estado de Mato Grosso do Sul, associado tanto a áreas rurais e urbanas (GALATI *et al.*, 1996, 2006; 2003a, b, 2006, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2001, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2010, 2010a, 2013, 2013a).

Os flebotomíneos são encontrados com frequência em ecótopos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e em cavernas (GALATI *et al.*, 2003, 2006), assim como, em ambientes rurais e urbanos, próximos a animais domésticos e habitações humanas, demonstrando que se encontram em processo de adaptação (TOLEZANO *et al.*, 2001; BARATA *et al.*, 2004). Isto vem ocorrendo devido à diminuição das matas nativas, com alteração dos habitats naturais e restrição dos ambientes utilizados por esses vetores. Essas alterações ambientais ocasionadas pelo homem também levaram à dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos flebotomíneos e conseqüentemente contribuindo para a ocupação de diferentes ambientes, inclusive o antrópico (GOMES *et al.*, 1989; MARZOCKI, 1989; TOLEZANO *et al.*, 2001).

Desse modo, aquelas espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (FORATTINI, 1973; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um risco constante como vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e humanos (BARBOSA *et al.*, 1999; BRASIL, 2010). Essa proximidade do homem a zonas de mata e a criação de animais domésticos tem atraído um grande número de espécies de flebotomíneos (MISSAWA *et al.*, 2008),

aumentando a probabilidade de transmissão do parasita para o homem conforme aumenta a proximidade de suas habitações aos habitats desses insetos (FORATTINI, 1973).

Os flebotomíneos tendem a não se afastar muito dos seus criadouros ou locais de abrigo, embora com a maioria não indo além dos 250 metros, podendo ser capturados até cerca de 1 km do ponto de soltura (MORRISON *et al.*, 1993; CASANOVA *et al.*, 2005). Segundo FORATTINI (1973); DOURADO *et al.* (1989); GOMES *et al.* (1989); MIRANDA *et al.* (1996); CORTE *et al.* (1996); COSTA (2001), o alcance de vôo dos flebotomíneos pode variar entre 200 a 1.000 metros. Os flebotomíneos no sul do Brasil e no Peru se dispersam no máximo 200 a 500 metros. Na Rússia foi registrado um máximo de 1.500 metros. O fato de terem os flebotomíneos pequena capacidade de dispersão não impede seu contato com os humanos, que têm o hábito de construir suas habitações próximas às matas (FORATTINI, 1973). Nessas áreas é evidente a adaptação de flebotomíneos e reservatórios silvestres de *Leishmania*, favorecendo a formação do ciclo do parasita no peridomicílio, na periferia de centros urbanos (TEODORO *et al.*, 1999a).

Entre os vetores de agentes da LT no Brasil, no Estado do Paraná, as espécies *Ny. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia neivai* e *Pintomyia fischeri* têm sido as mais frequentes em abrigos de animais domésticos, nas matas e no domicílio (TEODORO *et al.*, 2006). As três primeiras espécies foram assinaladas com infecção natural por protozoários do gênero *Leishmania* em outras regiões do Brasil, mostrando o seu potencial vetorial nos ambientes naturais e antrópicos. No Paraná, a infecção natural por *L. (V.) braziliensis* foi identificada em *Ny. whitmani* (LUZ *et al.*, 2000) e, em *Pi. pessoai* foi encontrada com infecção natural por *Leishmania* sp. (NEITZKE *et al.*, 2008). No Rio Grande do Sul esta espécie predominou no intradomicílio e peridomicílio, onde a taxa de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* sp. foi de 0,6% (SILVA & GRUNEWALD, 1999). No estado São Paulo *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia*, *Mg. migonei*, *Pi. pessoai* e *Expapillata firmatoi* foram infectadas experimentalmente e apresentaram formas infectantes de *L. (V.) braziliensis* (DINIZ *et al.*, 2014).

No Estado de São Paulo atribui-se preponderante papel vetorial da *L. (V.) braziliensis* a *Nyssomyia intermedia*, s. lat no ambiente domiciliar, e a *Mg. migonei* no ambiente extradomiciliar (GOMES & CAMARGO-NEVES, 1998). CAMARGO-NEVES *et al.* (2002) relataram pesquisas entomológicas em 159 municípios, dos quais 61,6% havia registro de casos autóctones de LT. Em 151 (95%) destes municípios, foram constatados a presença de *Ny. intermedia*, s. lat (88,1%), seguida de *Pi. fischeri* com 53,6%; *Ny. whitmani* com 53,6%; *Mg. migonei* com 49,7% e *Pi. pessoai* com 28,5%. Em estudos com isca humana, no noroeste

paulista, *Pi. pessoai* foi uma das espécies coletadas com frequência relativamente alta (GOMES *et al.*, 1989); e a segunda mais abundante (23,3%) no município de Corumbataí, centro-leste do estado de São Paulo, que segundo CUTOLO & ZUBEN (2008), a presença de *Pi. pessoai* e *Ny. whitmani* indica risco de transmissão de leishmaniose tegumentar.

No Estado de Mato Grosso, RANGEL *et al.* (1999) relataram a infecção natural por *e. (V.) braziliensis* em *Nyssomyia umbratilis*, sendo este flebotomíneo considerado o principal vetor de *L. (V.) guyanensis* na Amazônia, discorrendo, inclusive, sobre a alta atividade antropofílica desse díptero.

Ny. whitmani, uma das principais vetoras de *L. (V.) braziliensis* (RANGEL & LAINSON, 2003) foi a espécie mais frequente e apontada como a provável transmissora desse agente no município de Corguinho, estado de Mato Grosso do Sul (GALATI *et al.*, 1996); espécie também presente em áreas rurais na Serra da Bodoquena (GALATI *et al.*, 2006), no Pantanal, em Corumbá (BRAGA-MIRANDA *et al.*, 2006) e no município de Antônio João, fronteira com o país Paraguai (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Em área urbana de Campo Grande (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e em Bonito (NUNES *et al.*, 2008). Na Serra da Bodoquena, outra espécie de flebotomíneo *Lutzomyia almerioi* foi encontrada com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Viannia) sp.* (SAVANI *et al.*, 2005). Em Bonito, *Lu. almerioi* foi capaz de ser experimentalmente infectada com *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (SANTOS, 2007).

O Estado de Mato Grosso do Sul (MS) vem apresentando altos índices de infecções por leishmânias (OLIVEIRA *et al.*, 2003, 2006). *Bichromomyia flaviscutellata* foi encontrada naturalmente infectada por *L. (L.) amazonensis*, agente etiológico de leishmaniose cutânea, em Bonito (NUNES *et al.*, 2008); parasita este que teve a sua presença confirmada em soldados de um regimento militar em Bela Vista, MS (DORVAL *et al.*, 2006, 2009). Dois gatos domésticos em Ribas do Rio Pardo também foram encontrados infectados por *L. (L.) amazonensis* (DE SOUZA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2009); outros dois casos de cães domésticos infectados em Araçatuba, no estado de São Paulo (TOLEZANO *et al.*, 2007). E um caso de leishmaniose canina também por *L. (L.) amazonensis* proveniente da cidade de Cambé, Paraná (HOFFMANN *et al.*, 2012).

No município de Dourados, MS, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, em residências próximas a fragmentos de matas, *Ny. whitmani*, *Pa. bigeniculata* (= *Pa. shannoni*) e *Lu. longipalpis* foram encontradas naturalmente infectadas por *L. (L.) infantum* (VERLINDO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2013). Dentre outras espécies, *Ny. whitmani*

também foi encontrada naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis* na aldeia Jaguapiru, área indígena (SANTOS *et al.*, 2013).

2.3 BIOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são dípteros psicodídeos, de pequeno porte mediando de 2 a 3 mm e, distinguem-se dos demais insetos da família Psychodidae, por apresentam corpo mais delgado, aspecto hirsuto, devido ao revestimento piloso, constituído principalmente por cerdas finas e longas, pernas mais longas e finas; as asas são alongadas, um tanto estreitas, não tão intensamente pilosas e, quando em repouso, permanecem eretas, divergentes e afastadas da superfície corporal (FORATTINI, 1973); além de suas fêmeas necessitarem de sangue para a produção de ovos, razão pela qual foram agregados pelos taxonomistas na subfamília Phlebotominae (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Seu vôo é curto e baixo, saltitante e, é facilmente reconhecível pela atitude que adota quando em repouso, pois as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas (FORATTINI, 1973; YOUNG e DUNCAN, 1994).

Como os dípteros em geral, os flebotomíneos são holometábolos, tendo em seu ciclo vital uma fase de ovo, fase de larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), fase de pupa e, finalmente a fase adulta. Suas formas imaturas, de hábito terrestre, desenvolvem-se em criadouros constituídos por solos úmidos, ricos em matéria orgânica, ao abrigo da luz direta, entre raízes expostas, troncos de árvores, embaixo de folhas caídas e de pedras; em gretas de rochas, tocas de animais e nos ambientes antrópicos como pocilgas, galinheiros, canis, estábulos ou outros ecótopos nos quais as condições adequadas se façam presentes. Muitas vezes, o próprio criadouro funciona também como local de abrigo, sendo que estes variam de acordo com o micro-habitat, estação do ano, umidade relativa do ar e de acordo com a espécie. Pela sua fragilidade necessitam de locais que os protejam de mudanças bruscas que ocorrem no meio ambiente (FORATTINI, 1973; AGUIAR e MEDEIROS, 2003; BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Ambos os sexos necessitam de açúcares em sua dieta. Embora tenha sido relatado o encontro de machos com sangue no tubo digestório (GONTIJO *et al.*, 1987; SILVA e GRÜNEWALD, 1999), somente as fêmeas são consideradas hematófagas, sugando um largo espectro de animais como mamíferos, aves e animais pecilotermos (TESH *et al.*, 1992; NGUMBI *et al.*, 1992; MORRISON *et al.*, 1993, OGOSUKU *et al.*, 1994; COLMENARES *et al.*, 1995).

O sangue é necessário para o desenvolvimento ovariano e, o número de ovos produzidos é diretamente proporcional à quantidade de sangue ingerido, porém, há a possibilidade de autogenia, que é a produção de um grupo de ovos sem sugar sangue, utilizando reservas da fase de larva como já foi observado em algumas espécies de flebotomíneos; inclusive de partenogênese, observada em laboratório para *Pintomyia mamedei* (READY, 1979; LEHANE, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1994; BRAZIL e OLIVEIRA, 1999; MARCONDES, 2011).

De um modo geral, tem-se observado concordância gonotrófica (que consiste na produção de um grupo de ovos a cada refeição de sangue) para estes dípteros, porém, em algumas espécies têm sido observados dois repastos sanguíneos precedentes à oviposição (CHRISTENSEN e HERRER, 1980; BRAZIL *et al.*, 1991a, 1991b; ELNAIEM *et al.*, 1992). Uma das explicações para esse comportamento é o fato das fêmeas sofrerem com as variações climáticas, como altas temperaturas e baixas umidades; sendo prejudicadas em relação à capacidade de oviposição; necessitando de um segundo repasto para a manutenção hídrica (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

A atividade hematofágica predominante é noturna, porém, podem exercê-la durante o dia principalmente em ambientes com pouca luminosidade como cavernas e áreas florestais (GOMES *et al.*, 1989; GALATI *et al.*, 2003a, 2003b, 2006).

2.3.1 ALIMENTAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

As fêmeas, além de ingerir substâncias açucaradas de excreções de afídeos (pulgões), contendo melezitose, e de seiva de vegetais, sugam sangue de vários animais, para produzir ovos. Os machos somente sugam substâncias açucaradas. A ingestão de carboidratos é muito importante para o desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestório, e o protozoário também participa da lise da sacarose (MARCONDES, 2011).

Apenas as fêmeas praticam hematofagia em um largo espectro de hospedeiros, incluindo animais de sangue frio, aves e mamíferos (YOUNG e DUNCAN, 1994). Algumas espécies alimentam-se de sangue apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras podem praticar hematofagia múltipla durante um único ciclo de oviposição, o que as potencializa como vetores. O primeiro repasto sanguíneo ocorre, geralmente, a partir do segundo ou terceiro dias após a emergência das fêmeas. Fêmeas nascidas em laboratório, inicialmente, tendem a recusar a alimentação sanguínea, mas quando lhes oferecem solução açucarada se alimentam avidamente. Parece que o açúcar as estimula ao hematofagismo e, quando se

alterna a alimentação com sangue e açúcar, ocorre um aumento da longevidade (FORATTINI, 1973).

É provável que a passagem dos açúcares do divertículo para o tubo digestório se dê apenas no instante em que as atividades ou o momento fisiológico do inseto requeiram o consumo de energia. Os carboidratos tem papel importante no desenvolvimento e infectividade de *Leishmania*, não só como controlador da flora bacteriana intestinal, agindo como bacteriostáticos, mas também como fonte de energia para os parasitas que parecem se multiplicar mais facilmente no trato digestivo dos flebotomíneos na presença de açúcares (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

2.4 INTERAÇÃO LEISHMANIA-VETOR

Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos, desenvolvem parte de seu ciclo no organismo de vertebrados e parte em dípteros, na maioria das áreas do mundo, em Phlebotominae (Psychodidae), e na Austrália em Ceratopogonidae: *Forcipomyia (Lasyoella)* (PIMENTA *et al.*, 2003; DOUGALL *et al.*, 2011).

Existem várias espécies de *Leishmania* que podem ser transmitidas aos vertebrados mamíferos, inclusive aos humanos, por meio da picada de flebotomíneos na busca da alimentação sanguínea e, que são capazes de transmitir os parasitas, ocasionando as leishmanioses nas formas: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral. O ciclo de vida do protozoário é intracelular, independentemente do local onde a leishmaniose esteja se desenvolvendo nos mamíferos. Eles se localizam e se multiplicam sempre dentro de células do sistema mononuclear fagocitário (PIMENTA *et al.*, 2003).

Quando a fêmea de flebotomíneo realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere juntamente com o sangue, os macrófagos, e adquire as formas amastigotas do protozoário que atingem o intestino médio; sofrendo uma série de modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais (WALTERS e MODI, 1989; KILLICK-KENDRICK, 1990) necessárias à sobrevivência dos parasitas no hospedeiro e conseqüentemente à infecção (SACKS, 1989). Uma vez no trato digestivo do vetor, os parasitas assumem formas promastigotas, diferenciando-se então em promastigotas procíclicas, estágio que evita sua expulsão do intestino médio do inseto vetor. Posteriormente, a *Leishmania* assume sua forma promastigota metacíclica infectante, fase em que migra para as peças bucais, o que parece estar relacionado à ingestão de carboidratos pelos flebotomíneos (AÑEZ *et al.*, 1989). A

presença de açúcares contribui para a sobrevivência, desenvolvimento e infectividade da *Leishmania* no corpo do inseto (SCHLEIN e JACOBSON, 1994; JACOBSON *et al.*, 2001).

Passados alguns dias, ao realizar novo repasto, a fêmea inocula, juntamente com sua saliva, as formas promastigotas no hospedeiro. Essas formas, ao penetrarem nas células do sistema fagocítico mononuclear local, se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se intensamente (YOUNG e DUNCAN, 1994). O hospedeiro infectado desenvolve as formas amastigotas do parasita em seus macrófagos, o que pode levar aos sintomas da doença ou servir de reservatório para um próximo flebotomíneo reiniciar o ciclo parasitário. A transmissão das promastigotas dar-se-á quando o inseto infectado ao picar um hospedeiro, regurgitará formas metacíclicas, juntamente com o sangue. O regurgitamento ocorre devido ao bloqueio do gel secretado pelas promastigotas (KAMHAWI, 2006).

2.5 REQUISITOS DE INCRIMINAÇÃO VETORIAL

Estudos realizados por LAINSON e SHAW (1987a) têm descrito a especificidade entre o parasita e o vetor responsável pela sua transmissão; na qual a taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação correta da espécie de *Leishmania* em uma determinada espécie de flebotomíneo são de grande importância na epidemiologia das leishmanioses (GALATI *et al.*, 2003), pois permite estabelecer a capacidade vetorial da referida espécie.

Requisitos de incriminação vetorial propostos por KILLICK-KENDRICK (1990) e KILLICK-KENDRICK e RIOUX (2002) foram sugeridos para incriminar efetivamente uma determinada espécie de flebotomíneo como vetor de agentes de leishmanioses: a antropofilia da espécie; distribuição espacial em concordância com a ocorrência dos casos de infecção humana; infecção natural por parasitas, identificados como pertencentes à mesma espécie de *Leishmania* que infecta o homem; atração por mamíferos reservatórios de *Leishmania*, exemplares experimentalmente infectados com *Leishmania* devendo manter, em laboratório, todas as etapas do desenvolvimento parasitário e a prova conclusiva de incriminação vetorial - a capacidade desses flebotomíneos de se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasita, através da picada, de hamster para hamster.

Observações baseadas em dados epidemiológicos e/ou experimentais sugerem ou incriminam algumas espécies de flebotomíneos como transmissoras das leishmanioses, associadas às espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Porém, apenas algumas espécies têm sido consideradas como importantes vetoras,

principalmente espécimes de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e *Nyssomyia* e *Psychodopygus*. Dentre elas as mais comumente incriminadas em várias regiões do Brasil são *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia intermedia*, vetoras de agentes de LT, com diversos relatos de infecção natural por *L. (V.) braziliensis*. E *Lutzomyia longipalpis* é considerada como a principal vetora da LV no Brasil, baseado em vários estudos de infecção natural e experimental com *L. (L.) infantum*; aspectos comportamentais biológicos e ecológicos desta espécie, além da distribuição coincidente da doença (LAINSON e SHAW, 1987b).

Embora várias espécies de flebotomíneos têm sido implicadas na transmissão de *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2010; LAINSON e SHAW, 2005), apenas *Psychodopygus wellcomei* teve sua competência vetorial demonstrada (RYAN *et al.*, 1987).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a competência vetorial da espécie *Nyssomyia whitmani* em transmitir *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer colônia de *Ny. whitmani* em laboratório e verificar a sua suscetibilidade experimental ao parasita com vistas a avaliar a competência vetorial de *Ny. whitmani* à *L. (L.) amazonensis*.

4 HIPÓTESE

No estado de Mato Grosso do Sul, casos de leishmaniose atribuídos à *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* tem sido identificados em humanos. *Ny. whitmani*, uma espécie de maior distribuição e frequência no estado tem sido encontrada naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Todavia, ainda não foi identificada a sua infecção por *L. (L.) amazonensis* em flebotomíneos.

Tendo-se em vista que a espécie suporta o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, o presente estudo teve como hipótese, que *Ny. whitmani* apresenta capacidade de infectar-se por *L. (L.) amazonensis*, desenvolver as formas infectantes do parasita e transmiti-los à hamsters não infectados (suscetíveis), demonstrando assim a sua competência vetorial para este parasita.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no município de Dourados, localizado no sul da Região Centro-Oeste do Brasil, no sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul (MS). O município localiza-se na zona do planalto do estado de MS, próximo à Serra de Maracaju na bacia do Rio Paraná. O relevo é plano com suaves ondulações, e encontra-se em uma altitude média de 430 metros. O clima no verão é tropical e úmido e no inverno tropical seco. O tipo de solo é o latossolo vermelho distroférico e distrófico, com alto potencial para a atividade agrícola. O Bioma é do tipo Savana (Cerrado) e Mata Atlântica.

A área territorial do município é de 4.086,237 Km² que compreende nove distritos: Formosa, Indápolis, Itaum, Guaçu, Macaúba, Panambi, Picadinha, Vila Vargas e Vila São Pedro e a área indígena, aldeias Jaguapiru e Bororó (IBGE, 2014).

O local de coleta de flebotomíneos, fragmento de mata remanescente do tipo floresta estacional semidecidual, Fazenda Coqueiro (M1P1) (antiga Azulão) (Figura 1), no bairro Vila Serrito, Km 12 da Rodovia Dourados-Itahum.

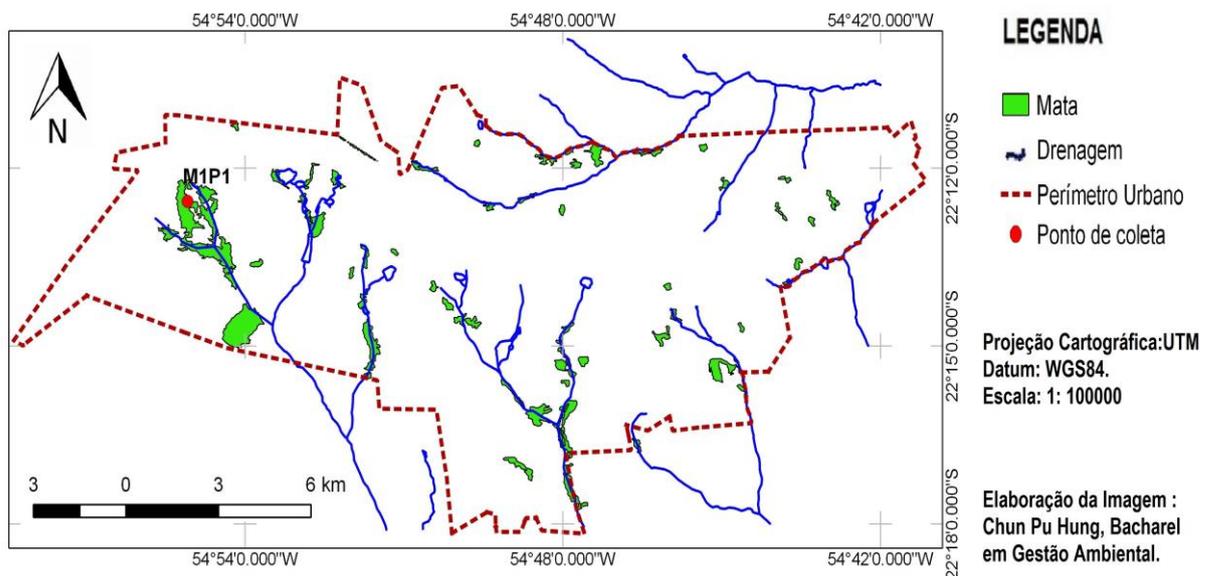


Figura 1. Ponto de coleta de flebotomíneos selvagens, fragmento de mata Fazenda Coqueiro (M1P1), no município de Dourados-MS. Material produzido a partir das imagens do satélite Landsat-8.

O material produzido foram a partir das Imagens de satélite Landsat-8, sensor OLI, com o emprego da banda pancromática, datada de 21/08/2013; e os dados digitais Shp

disponíveis pelos órgãos públicos, como no caso do limite do município e área urbana pelo IBGE e drenagem do IMASUL.

5.2 LOCAL E PERÍODO DE COLETA

As coletas de espécimes selvagens de flebotomíneos foram realizadas no interior do fragmento de mata (M1P1) (Figura 2), no período de 2011 a 2013. As coletas que obtiveram sucesso para estabelecimento da colônia de *Ny. whitmani* foram no período compreendido entre abril de 2012 a outubro de 2013.



Figura 2. Detalhes do fragmento de mata Fazenda Coqueiro, município de Dourados-MS. (A) e (B) Vista geral do fragmento de mata. (C) Entrada do fragmento de mata e (D) Trilha de acesso ao ponto de coleta de flebotomíneos selvagens.

5.3 METODOLOGIA DE COLETA

Para as coletas de espécimes selvagens de flebotomíneos foram utilizadas armadilhas de Shannon Preta e Branca, modificadas (GALATI *et al.*, 2001), no horário das 18 às 22 horas (Figura 3).



Figura 3. (A) Armadilha de Shannon Preta. (B) Armadilha de Shannon Branca.

Dois indivíduos realizaram a coleta dos espécimes machos e fêmeas de flebotomíneos (Figuras 4 e 5) com o auxílio de aspiradores elétricos (Figura 6), liberando-os posteriormente em gaiolas de criação, acrescido do fornecimento de maçã como fonte de carboidrato, sobre a gaiola, para garantir a sobrevivência dos flebotomíneos no horário de coleta dos espécimes; acondicionadas em caixas grandes de isopor até o transporte para o Laboratório de Insetos Vetores (LIVE), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).



Figura 4. Espécime selvagem macho de *Ny. whitmani*.



Figura 5. Espécime selvagem fêmea de *Ny. whitmani*.



Aspirador elétrico acoplado a uma garrafa PET e a uma bateria para coleta de espécimes de flebotomíneos.

Garrafa Pet com espécimes selvagens vivos de flebotomíneos para estabelecimento de colônia.



Fotos: Magda Freitas Fernandes (2011-2013)

Figura 6. Aspirador elétrico para coleta de espécimes selvagens vivos de flebotomíneos para estabelecimento de colônia de *Ny. whitmani* em laboratório.

As gaiolas de criação com os espécimes selvagens de flebotomíneos foram acondicionadas em caixas grandes de isopor revestidas internamente com uma camada de gesso pedra creme e tecidos umedecidos para manter a umidade do microambiente (Figura 7). Posteriormente, os espécimes vivos foram transportados para o LIVE, UFGD.

Foi utilizada uma caixa de isopor para acondicionar as gaiolas de criação com espécimes vivos de flebotomíneos para as coletas em campo (na mata) e outra no laboratório para estabelecimento da colônia de *Ny. whitmani*.



Foto: Magda Freitas Fernandes (2012)

Figura 7. Gaiolas de criação com espécimes vivos de flebotomíneos, acondicionadas em caixa de isopor revestida internamente com gesso pedra creme.

5.4 OBTENÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO (F1) DE FLEBOTOMÍNEOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Os adultos machos e fêmeas selvagens de flebotomíneos, trazidos do campo, na mesma noite da coleta, foram mantidos juntos nas gaiolas de criação para o acasalamento e o repasto sanguíneo pelas fêmeas. A alimentação sanguínea foi feita em hamsters, linhagem *Mesocricetus auratus*, não infectados (suscetíveis), jovens (2 a 4 meses de idade), que ficaram expostos às picadas das fêmeas por duas ou quatro horas.

Foi colocado um hamster dentro de cada gaiola. Os animais foram anestesiados antes da exposição às picadas, com Ketamina e Xilazina (proporção de 2:1). Foi administrado 0,25mL ou 0,30mL do produto final, conforme o peso do animal. Estes foram posicionados com a face ventral para cima, expondo as áreas corporais, de modo a facilitar a alimentação das fêmeas de flebotomíneos.

Os adultos selvagens foram mantidos nas gaiolas por 48 horas após o repasto sanguíneo, quando então as fêmeas selvagens ingurgitadas (visivelmente com sangue) foram

individualizadas para a postura dos ovos (oviposição). O número de dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição foi aproximadamente de 7 a 10 dias.

Para a individualização das fêmeas ingurgitadas (Figura 8A) foram utilizados tubos de polietileno (35,5 mm altura X 26,7 mm diâmetro, capacidade 15 mL), contendo uma camada de gesso pedra creme no fundo, umedecida; como substrato para a postura dos ovos (Figura 8B e D) e para a manutenção da umidade do microambiente. As fêmeas que foram individualizadas para obtenção de F1, após morrerem foram dissecadas para confirmação da espécie mediante aspecto morfológico das espermatecas (Figura 8C), segundo a nomenclatura adotada para a identificação de flebotomíneos de GALATI (2003, 2014) e a abreviação dos gêneros, a de MARCONDES (2007).

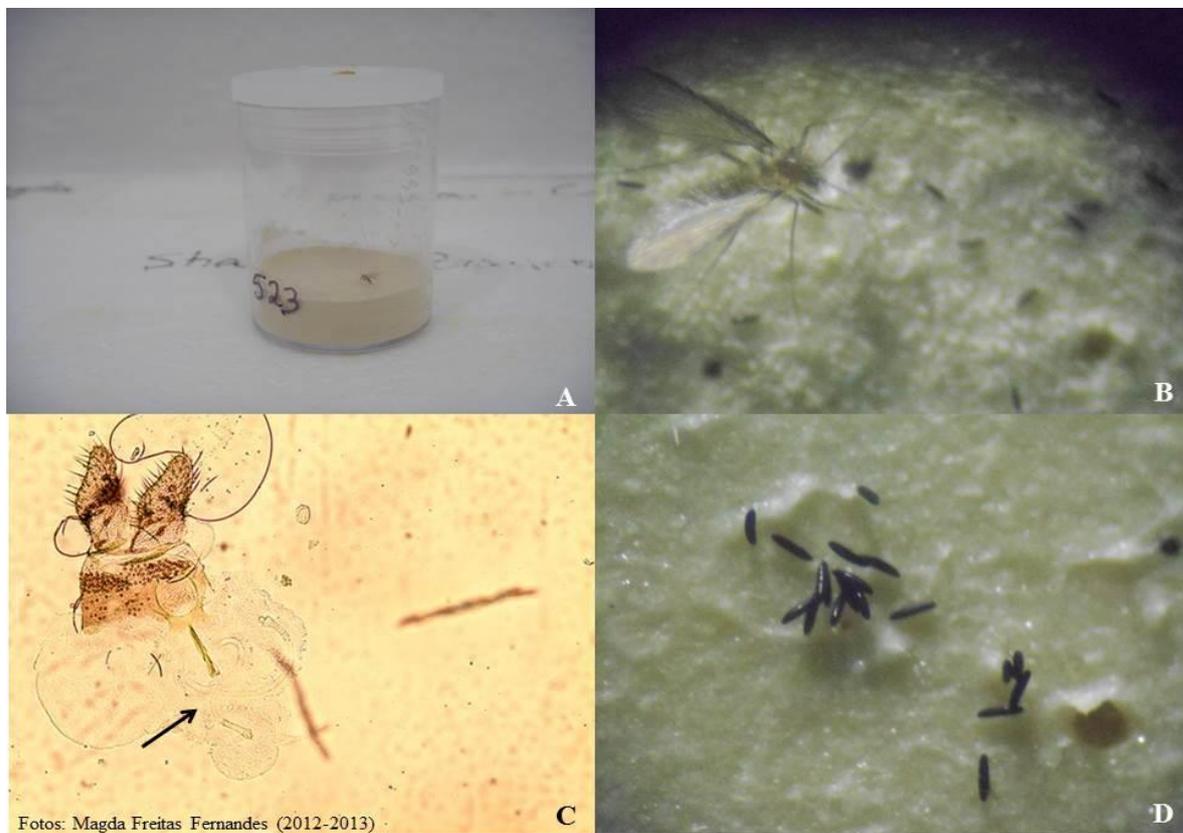


Figura 8. (A) Fêmea selvagem de flebotomíneo individualizada para postura dos ovos. (B) Fêmea de *Ny. whitmani* ovipondo no substrato (gesso). (C) Genitália de fêmea de *Ny. whitmani*. Detalhe seta: par de espermatecas. (D) Ovos de *Ny. whitmani*.

Esses tubos foram tampados com tampa plástica contendo um furo em seu meio, vedado com uma tela de nylon presa à tampa (Figura 9A). Sobre a tela colocou-se pedacinhos de maçã como fonte de carboidrato para sobrevivência das fêmeas. Após a postura das fêmeas de flebotomíneos, os ovos de *Ny. whitmani* foram removidos e transferidos para as placas de

cultivo (com gesso pedra creme) umedecidas (Figura (D-1)) para o desenvolvimento das formas imaturas: quatro estádios larvais: primeiro estágio (L1), segundo estágio (L2), terceiro estágio (L3), quarto estágio (L4)) e um pupal até à emergência dos insetos adultos.

Foram utilizadas dois modelos de placas de cultivo (placas de Petri de acrílico) para o desenvolvimento das formas imaturas de flebotomíneos. O modelo 1 (6 cm de diâmetro por 2,5 cm de altura) e que apresenta a borda superior com encaixe que se ajusta perfeitamente à tampa (Figura 9B-1 e D-1); e o modelo 2 (5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura), este encaixe não ocorre (Figura 9C-2 e D-2).

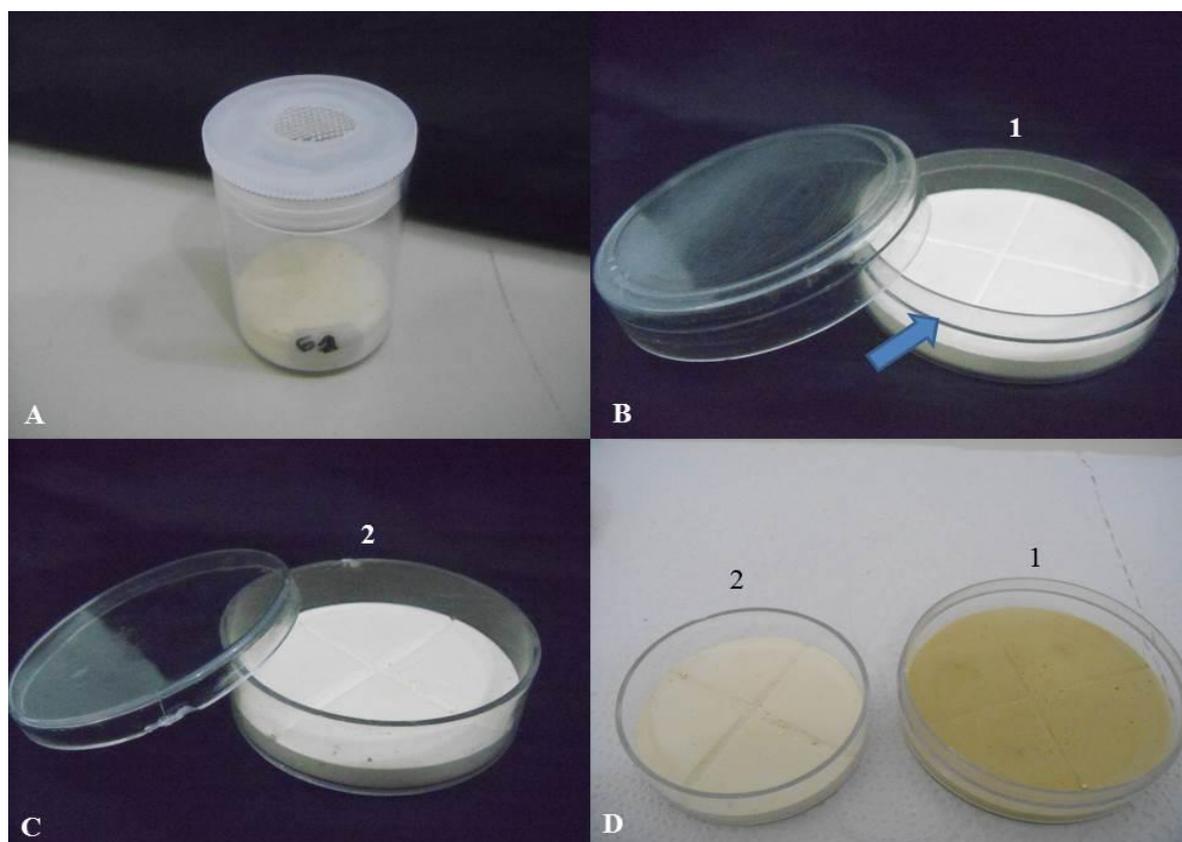


Figura 9. (A) Tubo de polietileno de tampa plástica com um furo em seu meio. (B-1) Placa de cultivo modelo 1, seta mostrando borda superior com encaixe que se ajusta perfeitamente à tampa. (C) Placa de cultivo modelo 2 - encaixe não ocorre na borda superior. (D) D-1 Coloração do gesso pedra creme quando umedecido.

Foram utilizados dois modelos de placas de cultivo, porque no decorrer do trabalho, observou-se que as placas que não tinham o encaixe na borda, as larvas a partir do 4º estágio (L4) escapavam para o meio externo, assim como já observado por HERTIG e JOHNSON (1961), que inferiram que a elevada densidade populacional poderia agir como fator irritante, incitando as larvas a abandonarem o ambiente, quando prestes a se tornarem pupas.

Observou-se que a placa modelo 2, a vedação não é hermética, o que pode ter contribuído para a redução da umidade, levando à fuga das larvas para o interior da caixa de isopor que era revestida internamente com gesso e com tecidos umedecidos para a manutenção da umidade. É possível também que a alta densidade populacional e/ou a competição por alimento no seu micro-habitat incitasse as larvas à fuga.

Conforme FORATTINI (1973) para a sobrevivência larval é necessária a presença de substrato úmido. Contudo, torna-se difícil definir com precisão o grau exato de umidade requerido para o desenvolvimento dessas formas imaturas. Invariavelmente morrem quando o teor de umidade chega a 100%, o mesmo ocorrendo na ausência de contato com o substrato úmido.

Por esta razão adotou-se para as placas de cultivo, o substrato de gesso pedra creme umedecido, mas que não formasse película líquida sobre a superfície. Foi utilizado papel filtro, quando necessário, apenas encostando parte dele na água para retirar o excesso.

Os tubos com as fêmeas selvagens individualizadas e as placas de cultivo com as formas imaturas F1 de *Ny. whtimani* foram mantidos em caixas de isopor menores, também revestidas internamente com uma camada fina de gesso pedra creme e/ou com tecidos umedecidos para manutenção da umidade e temperatura do microambiente (Figura 10). A temperatura e umidade interna das caixas de isopor foram aferidas diariamente com a utilização de termohigrômetro.



Figura 10. (A) Tubos com fêmeas individualizadas e pedacinhos de maçã sob a tela como fonte de carboidrato para as fêmeas. (B) Formas imaturas em placas de cultivo. (C) Tubos com fêmeas individualizadas e placas de cultivo com formas imaturas mantidos em caixas de isopor.

Os insetos foram mantidos a 25-27°C e umidade de 60 a 70%, em sala de criação climatizada com temperatura e umidade relativa controlada e com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. As paredes e portas do insetário vedadas e porta de entrada com cortina de vento para evitar a fuga de insetos e uma antecâmara para a biossegurança do ambiente.

5.5 REMOÇÃO E TRANSFERÊNCIA DOS OVOS DE FLEBOTOMÍNEOS

Para a remoção dos ovos, inicialmente adotou-se por meio líquido (água). No entanto, a dificuldade era grande e gastava-se muito tempo para a transferência para a placa de cultivo. Dependendo do número de fêmeas individualizadas e da quantidade de ovos por tubo, demorava-se dois dias ou mais para finalizar a transferência dos ovos; além do excesso de umidade no meio de cultivo, provocando a morte de larvas L1 e/ou prejudicando a eclosão das mesmas; também acelerando o crescimento excessivo de hifas dos fungos quando era colocada a ração para alimentação, provocando alta mortalidade do 1º estágio (L1).

WATERSTON (1922) e BARRETO (1942) verificaram que o excesso de umidade forma uma película líquida sobre os ovos e foi considerado como prejudicial. Em consequência, ocorre retardo no desenvolvimento embrionário, diretamente proporcional à duração do período de imersão. Decorridas 24 a 48 horas dentro d'água ou três dias de cobertura pela película líquida, não ocorria mais a eclosão das larvas (WHITTINGHAM e ROOK, 1923; BARRETO, 1942), ou então a imersão por alguns dias poderia resultar na eclosão de larvas que, porém, morriam em seguida (SHERLOCK e SHERLOCK, 1959).

O fato de que o contato com a água, pelos menos por tempo limitado, não afetava substancialmente os ovos, ensejou a vários pesquisadores o uso deste líquido para removê-los dos vários substratos e colocá-los nos meio de cultivo, de modo rotineiro, com o subseqüente resultado do estabelecimento de colônias de flebotomíneos (WATERSTON, 1922; HERTIG, 1940; HERTIG e JOHNSON, 1961; ELDRIDGE *et al.*, 1963; CHANIOTIS e ANDERSON, 1964; CHANIOTIS, 1967).

Segundo FORATTINI (1973), as fêmeas de flebotomíneos põem seus ovos isoladamente ou em pequenos conjuntos sobre o substrato onde permanecem aderidos por substância formada de grânulos, produzida pelas glândulas acessórias que se abrem na câmara genital. Os ovos apresentam pouca resistência à dessecação e necessitam de umidade elevada para se desenvolverem. Quando postos em substratos com baixo teor de umidade, murcham rapidamente e não há eclosão de larvas, mesmo quando reconduzidos para ambientes úmidos onde readquirem a forma normal; a sensibilidade dos ovos à dessecação aumenta à medida que se aproxima o momento de eclosão das larvas.

Considerando a necessidade de uma grande quantidade de ovos viáveis que pudesse gerar adultos em número suficiente para os experimentos de competência vetorial e da redução de tempo para a remoção dos ovos para o meio de cultivo, evitando danos para o desenvolvimento embrionário e eclosão das larvas, buscou-se um método alternativo para a remoção e transferência dos ovos.

E esse método consistiu da utilização de um pincel com poucos fios apenas para deslocar o ovo do substrato (Figura 11A). A seguir, o tubo foi invertido com a boca apontada para o interior de uma placa de cultivo (com o gesso já umedecido), e na superfície externa do fundo do tubo, foram dadas pequenas batidas com a base de uma pinça para que os ovos caíssem (Figura 11B e C). É importante limpar bem os fios do pincel quando fizer a transferência de ovos de um próximo tubo, se as fêmeas individualizadas ainda não foram identificadas. Todo o procedimento foi feito sob um estereomicroscópio.

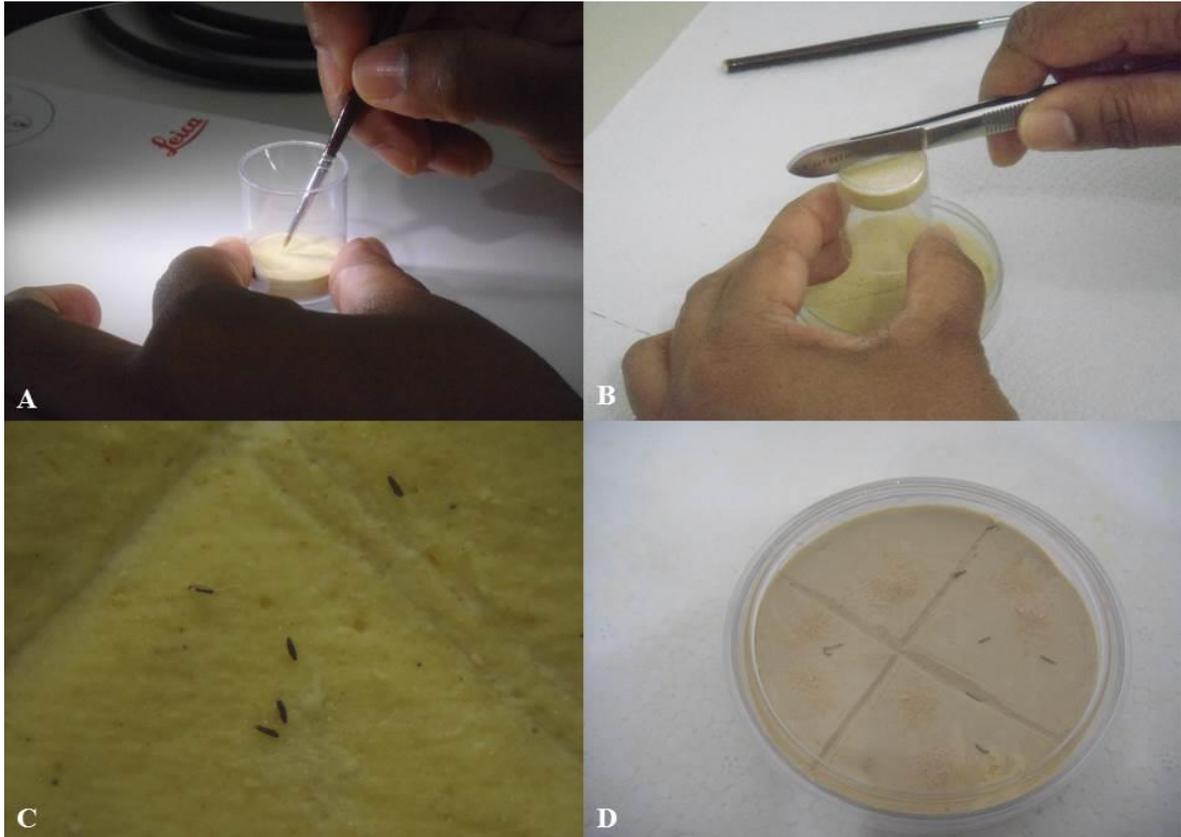


Figura 11. (A) Pincel para deslocar o ovo do substrato (gesso). (B) Tubo foi invertido e batendo-se com um pinça externamente, no fundo do tubo, os ovos caem sobre a camada de gesso. (C) Ovos sobre a camada de gesso umedecido na placa de cultivo. (D) Placa de cultivo com 4º estágio larval (L4) de *Ny. whitmani*.

Na técnica usual, por meio líquido, a média de 38 ovos, a remoção e transferência dos ovos demorava cerca de 10 minutos por tubo, aumentando à medida que o número de ovos fosse superior. Na técnica atual, aproximadamente um minuto por tubo, independente da quantidade de ovos e não houve mortalidade de larvas L1 e também não houve o aumento excessivo de hifas dos fungos. O tempo de transferência reduziu muito, em relação à técnica de remoção dos ovos por meio líquido.

5.6 ALIMENTAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DAS FORMAS IMATURAS

À medida que as larvas (L1) eclodiam era acrescido ração para alimentá-las até o último estágio (L4). Para a alimentação larval foi utilizada a mistura de fezes secas de codorna e solo da mata (ração 1), em proporções iguais, triturada, peneirada e autoclavada e/ou levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (ração 2), também triturada e autoclavada. A ração 2 foi utilizada somente para as L1 e início da L2.

Segundo FORATTINI (1973) no período de um ou dois dias que precede a pupação, a L4 deixa de se alimentar, procura um suporte sólido e inicia o processo, eliminando todo o seu conteúdo intestinal e perdendo gradativamente, a mobilidade e, se fixam ao substrato pela extremidade posterior, assumindo a posição ereta. As pupas permanecem imóveis, presas ao substrato, exceto com movimentos de flexão e extensão, conforme o estímulo. As formas pupais não se alimentam e, em condições favoráveis, tem a duração de pouco mais de uma a duas semanas.

Os adultos que iam emergindo, eram transferidos para as gaiolas de criação com o auxílio de uma lanterna ao fundo, abrindo-se a placa de Petri para facilitar a saída dos mesmos e, foi oferecido maçã como fonte energética.

O acompanhamento das formas imaturas foi realizado diariamente sob estereomicroscópio, com luz de Led fria para evitar a dessecação e morte das formas imaturas; retirar as hifas dos fungos que cresciam sobre o alimento, pois as larvas L1 ficavam presas nas hifas, impedindo-as de se locomoverem e de se alimentarem, levando-as à morte.

O formato das larvas durante todos os estádios permaneceu cilíndrico, tipo vermiforme e, o padrão de coloração variou, de translúcido a amarelo, à medida que iam avançando os estádios. Os quatro estádios larvais diferem sensivelmente entre si, quanto ao tamanho. E os estádios larvais têm duração diferente. Os períodos mais longos correspondem ao 1º e 4º estádios e os mais breves ao 2º e 3º. O estágio L1 é o único que pode ser distinguido facilmente, pois apresenta duas cerdas caudais na porção terminal de seu corpo. A L2 possui dois pares de cerdas caudais na porção final do abdomen e coloração esclerotizada (mais escura); a L3 também possui dois pares de cerdas caudais, com a porção final e as laterais do abdômen esclerotizada, que a diferencia da L2 (Figura 12).

A L4 com dois pares de cerdas caudais se diferencia pelo tamanho, bem maior que a L3 e pelo escurecimento dos dois últimos tergitos. A pupa tem coloração esbranquiçada ou amarelada, escurecendo progressivamente à medida que se aproxima a emergência do adulto. Os adultos, ao emergirem da pupa, permaneciam inativos e não reagiam aos estímulos. Após a emergência, os adultos foram liberados em gaiolas e foi oferecido maçã como fonte de carboidrato (Figura 13).

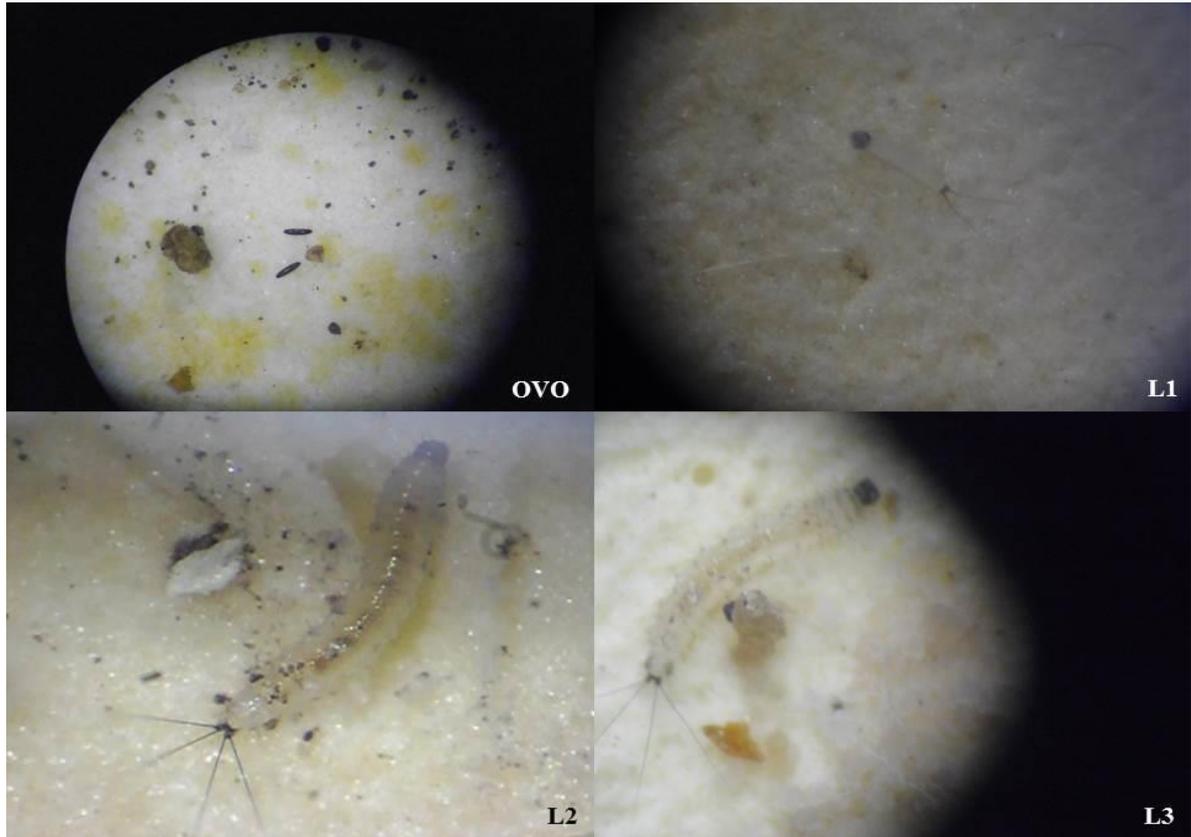


Figura 12. Formas imaturas de *Ny. whitmani*. Ovos; 1º estágio (L1); 2º estágio (L2) e 3º estágio (L3).

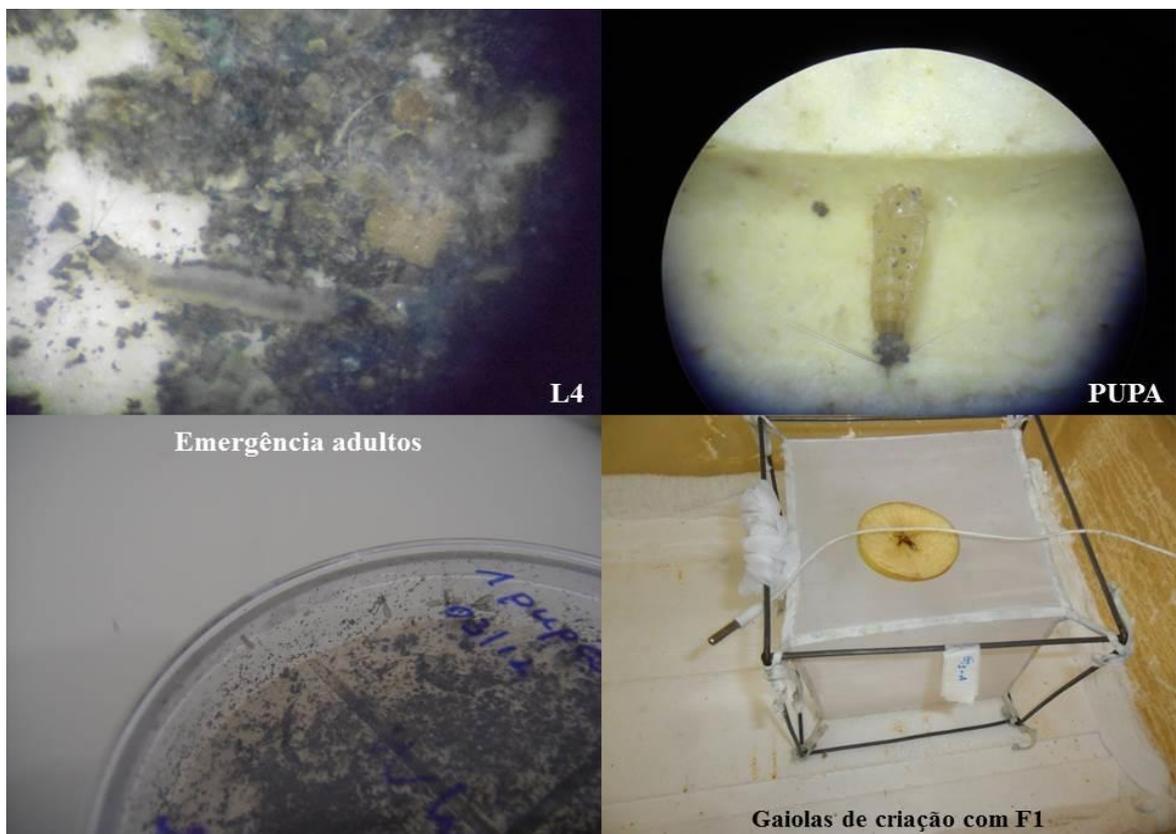


Figura 13. Formas imaturas de *Ny. whitmani*. 4º estágio (L4); pupa e adultos (emergência).

Segundo FORATTINI (1973), logo após a emergência, o adulto mantém-se em posição de pouso e pouco reativo aos estímulos, porque necessita de tempo para que se processe o endurecimento da quitina que o reveste, possibilitando-o assim para o vôo.

Conforme os espécimes adultos de *Ny. whitmani* (F1) foram emergindo foram transferidos para as gaiolas de criação; permaneceram por três dias recebendo maçã como fonte de carboidrato. Após este período, fizeram o 1º repasto sanguíneo em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis*.

5.7 DISSECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE FORMAS FLAGELADAS EM FÊMEAS SELVAGENS

As fêmeas selvagens de flebotomíneos provenientes do campo que foram individualizadas para obtenção Da 1ª geração (F1), após morrerem foram dissecadas para a pesquisa de flagelados no tubo digestório. As fêmeas que se mostraram negativas para flagelados na dissecção foram agrupadas em *pools* individuais ou até 10 espécimes por tubo de polietileno (ependorf de 1,5 mL), contendo álcool isopropílico para a realização da PCR a fim de investigar a presença de DNA de *Leishmania* (PAIVA *et al.*, 2004, 2006, 2007). Em nenhuma das fêmeas dissecadas observou-se protozoários parasitas flagelados.

O conteúdo da lamínula e do tubo digestório dos espécimes foram mantidos em tubos de polietileno em álcool isopropílico para confirmação do parasita por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR-), tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pb de *Leishmania* seguido da identificação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com a enzima de restrição *Hae* III.

A dissecção foi feita sob estereomicroscópio, com auxílio de estiletos, em lâminas esterilizadas. Cada fêmea foi colocada em uma gota de solução salina sobre a lâmina, separando a cabeça do restante do corpo. Para a dissecção fixou-se o tórax com um dos estiletos e com o outro, fez-se um movimento de tração entre o 7º e o 8º tergitos abdominais de modo a expor o tubo digestório, que vem preso ao 8º tergito e às demais partes da genitália feminina. Sob um microscópio óptico e aumento de 400 vezes, fez-se a identificação das espécies.

5.8 CEPA DE *L. (L.) amazonensis* UTILIZADA PARA AS EXPERIMENTAÇÕES

Inicialmente foi utilizada a cepa PH8 R24 (Repique 24): R24 3N + LIT de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para inocular os dois primeiros hamsters, cepa proveniente do Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fiocruz (Minas Gerais). Para as inoculações foram utilizados 0,5 mL (10^5) de parasitas em hamsters suscetíveis (não infectados), via subcutânea, no coxim plantar, perna posterior direita.

Para os experimentos de suscetibilidade foram utilizados nove hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* e 27 hamsters suscetíveis para os experimentos de transmissão via picada de flebotomíneos.

5.9 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O projeto foi submetido ao Comitê de Conduta Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), conforme normas da Resolução N° 196, de 10 de outubro de 1996. Conforme mencionado, os espécimes de flebotomíneos foram mantidos em local adequado e protegido contra a fuga. Após a alimentação em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis*, os insetos permaneceram nas gaiolas de criação, em caixas de isopor fechadas, em área de isolamento. Os hamsters infectados e os não infectados (suscetíveis) expostos às picadas de fêmeas selvagens e de primeira geração (F1) de *Ny. whitmani*, foram mantidos em segurança, isolados em caixas próprias com alimento e água *ad libidum*, no biotério do LIVE da FCBA/UFGD. Após o término dos experimentos, os hamsters foram eutanasiados e o descarte dos animais foi feito segundo normas de biossegurança preconizadas.

5.10 METODOLOGIA DE REPASTO INFECTIVO E REPASTO SANGUÍNEO EM HAMSTERS SUSCETÍVEIS

As fêmeas que emergiram de *Ny. whitmani* F1 foram submetidas a realizarem o 1° repasto sanguíneo em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* (Figura 14), após o quarto dia do repasto infectivo, período para o parasita completar o ciclo de vida dentro do inseto vetor, nas formas infectivas promastigotas metacíclicas, para os vertebrados (PIMENTA *et al.*, 2003).



Figura 14. (A) Gaiolas com hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* com tela de tecido de voil para proteção. (B) e (C) Detalhe do local de inoculação de *L. (L.) amazonensis*, coxim plantar de uma das pernas.

Esperados aproximadamente uma hora após o repasto infectivo; as fêmeas ingurgitadas (observado visivelmente a presença de sangue) (Figura 15A) foram retiradas com capturador de castro (Figura 15B) e, posteriormente liberadas em novas gaiolas para o 2º repasto sanguíneo.

Após este período de quatro dias, as fêmeas foram submetidas a uma nova alimentação em hamsters suscetíveis (um para cada gaiola) (Figura 15C); e consecutivamente até as fêmeas fazerem o 2º repasto sanguíneo, enquanto vivas. A cada dia, após o 2º repasto, as fêmeas ingurgitadas eram retiradas e transferidas para um pote plástico com gesso úmido no fundo (Figura 15D) e como fonte de carboidrato maçã sobre a tampa (furo de 2 cm de diâmetro, tampado com tecido de náilon) para posterior dissecação e observação de formas infectantes promastigotas metacíclicas.

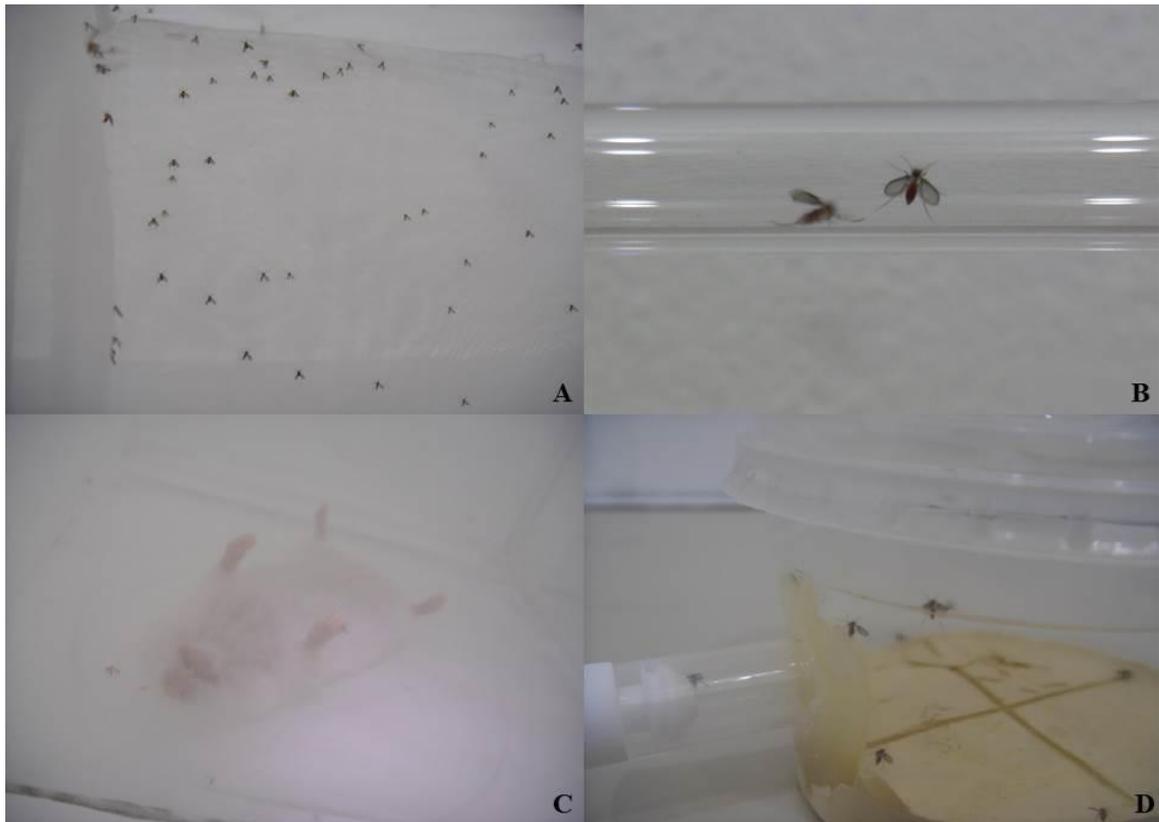


Figura 15. (A) Fêmeas de *Ny. whitmani* (F1) ingurgitadas do repasto infectivo. (B) Fêmeas ingurgitadas retiradas com capturador de castro. (D) Pote com fêmeas ingurgitadas para dissecação.

5.11 TESTES DE SUSCETIBILIDADE DE *Ny. whitmani* F1 PARA *L. (L.) amazonensis* E DE TRANSMISSÃO VIA PICADA

Os testes de suscetibilidade com fêmeas de *Ny. whitmani* F1 foram desenvolvidos em duas etapas: 1ª etapa – Experimento 1 (coleta de 12/09/2013) e 2ª etapa – Experimento 2 (coleta de 28/10/2013).

Os machos e fêmeas conforme foram emergindo, separados em gaiolas de criação, após três dias de idade, as fêmeas foram alimentadas em hamster, um por gaiola, experimentalmente infectado por *L. (L.) amazonensis*, para realização dos Experimentos 1 e 2.

As fêmeas foram expostas à hamster experimentalmente infectado para o repasto infectivo: teste de suscetibilidade e à hamsters suscetíveis (não infectados) até realizarem o 2º repasto sanguíneo: de transmissão via picada de fêmeas de *Ny. whitmani* (demonstração da competência vetorial).

Para o experimento 1, emergiram 156 espécimes vivos de *Ny. whitmani*, dos quais 83 fêmeas; destas 57 fêmeas fizeram o repasto infectivo e para o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis, 21 fêmeas.

Foram utilizados seis hamsters suscetíveis para esta primeira etapa (Figura 16).

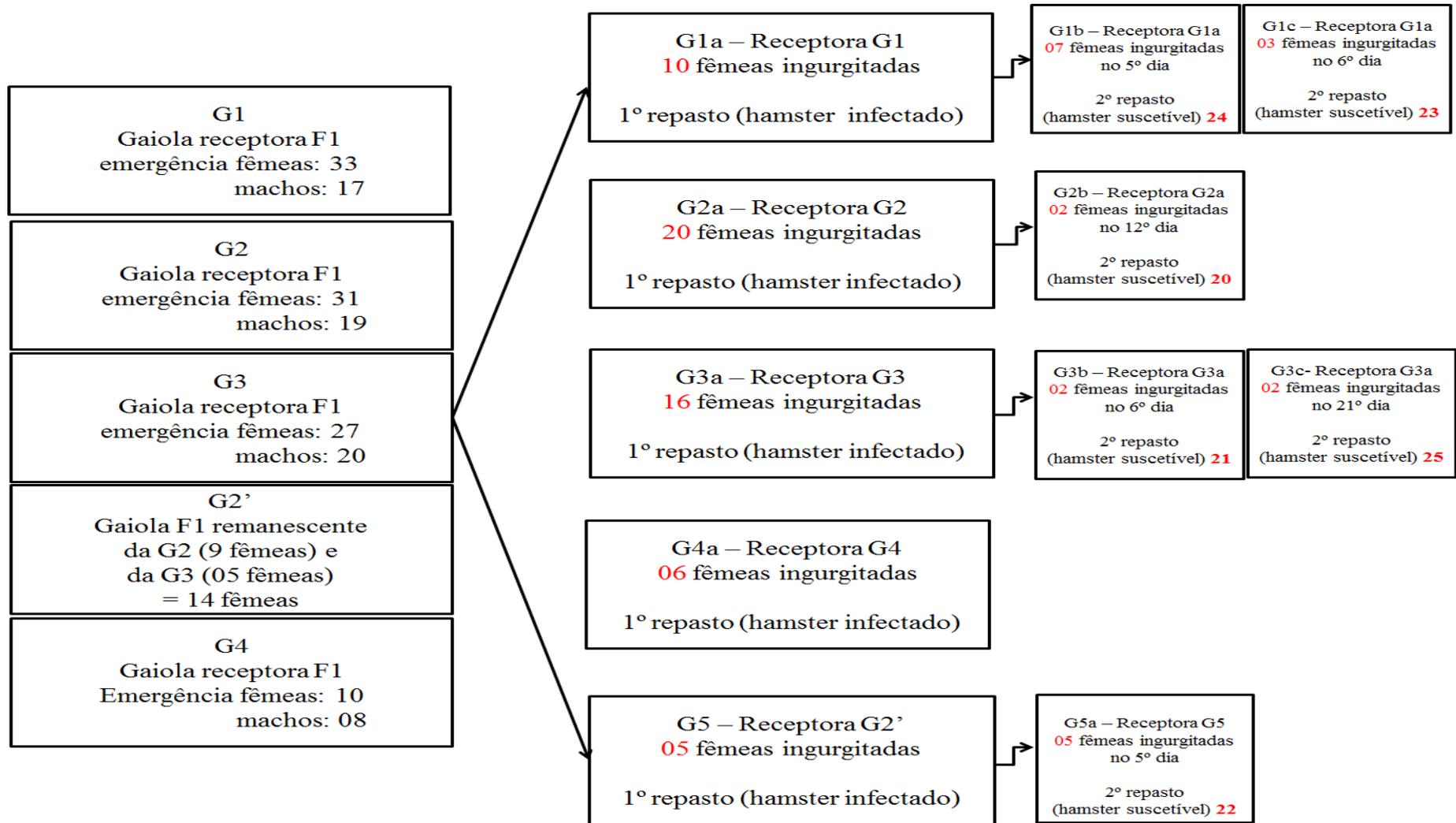


Figura 16. Desenho esquemático da metodologia utilizada conforme a emergência dos espécimes vivos de *Ny. whitmani* F1; das fêmeas ingurgitadas no repasto infectivo e o 2° repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis – **Experimento 1.**

Para o experimento 2, emergiram 911 espécimes de *Ny. whitmani*, dos quais 313 fêmeas fizeram o repasto infectivo e para o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis, 134 fêmeas.

As gaiolas de criação com os espécimes de *Ny. whitmani* F1 foram revisadas duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde) para acompanhamento da mortalidade das fêmeas. Na medida em que as fêmeas foram morrendo, foram dissecadas para observação de protozoários flagelados e acondicionadas em tubo eppendorf com álcool isopropílico para análise molecular.

Nesta etapa foram expostos 21 hamsters suscetíveis às picadas de fêmeas de *Ny. whitmani* F1, ingurgitadas no repasto infectivo (Figura 17).

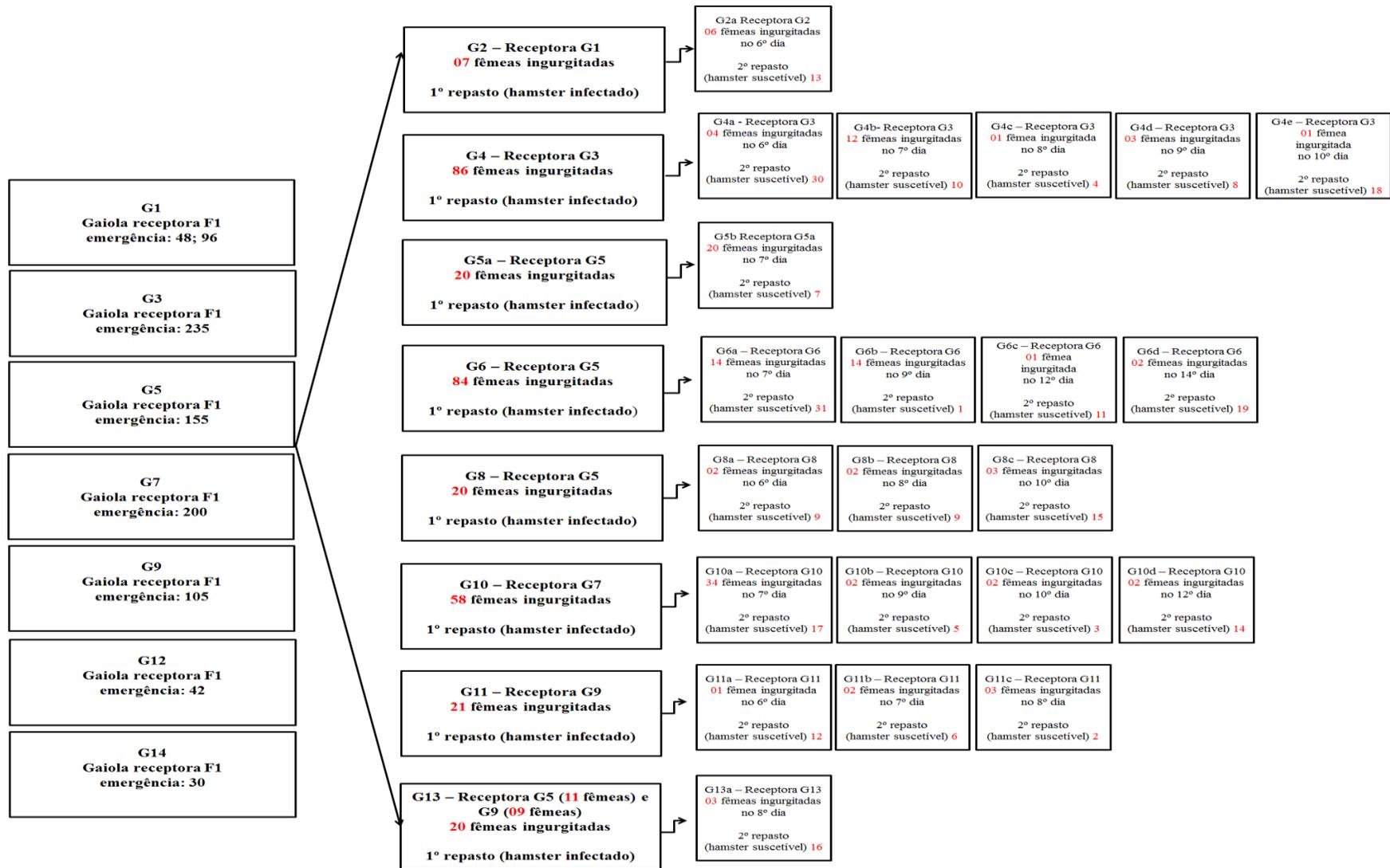


Figura 17. Desenho esquemático da metodologia utilizada conforme a emergência dos espécimes vivos de *Ny. whitmani* F1; das fêmeas ingurgitadas no repasto infectivo e o 2° repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis – **Experimento 2.**

5.12 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE BAÇO DOS HAMSTERS SUSCETÍVEIS

Os animais foram observados semanalmente durante 40 dias para verificar o aparecimento de lesão, via picada. O período para manifestação de lesões em hamsters por *L. (L.) amazonensis* é de aproximadamente 40 a 60 dias.

Após 40 dias foram eutanasiados e realizada a necrópsia para a pesquisa dos parasitas por aposição de baço, fígado e pele em lâmina (*imprint*), corados por Giemsa e cultivados em meio de cultura específico (WALLTON *et al.*, 1977). Amostras de baço foram utilizadas para confirmação do parasita por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR-), tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 300 pb de *Leishmania* seguido da identificação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com a enzima de restrição *Hae* III.

As amostras foram trituradas com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 mL em 300 µl da solução de resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories) a 5%. A solução foi misturada com ajuda de vortex por 15 segundos e posterior centrifugação por 20s a 13.000 rpm. Colocado em banho-maria a 80°C por 30 min e após este tempo o procedimento foi repetido. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo eppendorf, devidamente esterilizado, e depois congelado a - 20°C.

5.12.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a amplificação da região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal ITS1 (SSU rRNA e 5.8S rRNA) de aproximadamente 300 pb (300 a 350 pb) de *Leishmania*, foram utilizados os oligonucleotídeos LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), segundo EL TAI *et al.* (2000). As reações foram desenvolvidas para um volume final de 25µL, utilizando um mix comercial (GoTaq® Green Master Mix - pH 8,5; 3 mM MgCl₂; 400µM de cada dNTP - Promega, Medisson, USA) e 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador.

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos, em termociclador (Bio Rad MyCycler®). Como controle negativo foi utilizado uma reação sem DNA e como controle positivo, amostra dos hamsters infectados

experimentalmente com a cepa padrão de *Le. amazonensis* do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou de Minas Gerais. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com gel red® e visualizados sob luz ultravioleta. Para tanto 8µL dos produtos amplificados foram homogeneizados com 2µL de solução de azul de bromofenol e submetidos à corrida eletroforética a 120 volts por 40 minutos em tampão tris-borato EDTA (TBE) 1x. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300nm.

5.12.2 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Os produtos das PCRs foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Hae III* (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5'.

5.12.3 INCUBAÇÃO COM *Hae III*

Foi adicionado 1µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima *Hae III*, 1µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C por 12 horas ('overnight'). Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por duas horas.

A enzima *Hae III* foi capaz de clivar o DNA da *Leishmania* em bandas com 120, 80 e 40 pb, possibilitando a identificação da espécie *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito por SCHÖNIAN *et al.* (2003).

5.13 ANÁLISE MOLECULAR DAS FÊMEAS DE *Ny. whitmani* F1

As fêmeas de *Ny. whitmani* F1 provenientes dos experimentos de suscetibilidade à *L. (L.) amazonensis* e após serem expostas aos hamsters suscetíveis também foram dissecadas; agrupadas em *pools* individuais ou até 10 espécimes por eppendorf de 1,5 mL, contendo álcool isopropílico para a realização da PCR, seguido da confirmação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com a enzima de restrição *Hae III*.

5.13.1 EXTRAÇÃO DO DNA DE *LEISHMANIA*

As extrações foram realizadas com flebotomíneos individualmente ou em *pools* de 10 espécimes por tubo. Os espécimes foram triturados com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 mL em 300 µl da solução de resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories) a 5%. A solução foi misturada com ajuda de vortex por 15s e posterior centrifugação por 20s a 13000 rpm. Foi colocado então em banho-maria a 80°C por 30 min e após este tempo o procedimento foi repetido. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo eppendorf, devidamente esterilizado, e depois congelado a – 20°C.

5.13.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

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

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, com pós-extensão a 72°C por 5 minutos, em termociclador de marca BIOER XP Cycler. Como controle negativo foi utilizado uma reação sem DNA e como controle positivo, cepas padrão do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou, Minas Gerais. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com gel red® e visualizados sob luz ultravioleta. Para tanto 8µL dos produtos amplificados foram homogeneizados com 2µL de solução de azul de bromofenol e submetidos à corrida eletroforética a 120 volts por 40 minutos em tampão tris-borato EDTA (TBE) 1x. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300nm.

5.13.3 PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Os produtos das PCRs foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Hae* III (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'....GG▼CC....3' ou 3'....CC▲GG....5'.

5.13.4 INCUBAÇÃO COM Hae III

Foi adicionado 1 µL de buffer 10x, uma unidade (1U) de enzima Hae III, 1 µg de DNA da PCR, completando-se o volume de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C 'overnight'. Após este período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por duas horas.

A enzima Hae III é capaz de clivar o DNA da *Leishmania* em bandas com 120, 80 e 40 pb, possibilitando a identificação das espécies *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito por SCHÖNIAN *et al.* 2003.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1 - Exposição de *Ny. whitmani* F1 à hamster experimentalmente infectado e teste de transmissão via picada à hamsters suscetíveis

Foram individualizadas 59 fêmeas selvagens de *Ny. whitmani* ingurgitadas para postura dos ovos. 53 fêmeas ovipuseram 2.036 ovos. A média de ovos foi de 38 ovos. Ao total emergiram 145 espécimes de *Ny. whitmani* F1; 62 machos e 83 fêmeas. A média de emergência foi de 55 dias.

Das 83 fêmeas que emergiram, 57 (68,67%) fêmeas fizeram o repasto infectivo. Das 57 fêmeas do repasto infectivo, 21 (36,84%) fizeram o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis. No 5º dia, 12 (57,14%) fêmeas fizeram o 2º repasto sanguíneo; no 6º dia, cinco (23,81%) fêmeas; no 12º dia, duas (9,52%) fêmeas e no 21º dia, duas (9,52%) fêmeas.

6.2 EXPERIMENTO 2 - Exposição de *Ny. whitmani* F1 à hamster experimentalmente infectado e teste de transmissão via picada à hamsters suscetíveis

Foram individualizadas 377 fêmeas selvagens ingurgitadas para postura dos ovos. 226 fêmeas de *Ny. whitmani* ovipuseram 9.426 ovos. A média foi de 42 ovos. Ao total emergiram 911 espécimes, 313 fêmeas fizeram o repasto infectivo.

Das 313 fêmeas, 134 fêmeas (42,81%) fizeram o 2º repasto sanguíneo em hamsters suscetíveis.

No 5º dia nenhuma fêmea fez o 2º repasto sanguíneo. No 6º dia, 13 (9,70%) fêmeas fizeram o 2º repasto sanguíneo. No 7º dia, 82 (61,19%) fêmeas; no 8º dia, nove (6,72%) fêmeas; 9º dia, 19 (14,18%) fêmeas; 10º dia, seis (4,48%) fêmeas; 12º dia, três (2,24%) fêmeas e no 14º dia, duas (1,49%) fêmeas.

Foram dissecadas algumas fêmeas ingurgitadas após realizarem o 2º repasto sanguíneo e foram visualizadas formas promastigotas em duas fêmeas do 7º dia (gaiola G10a); uma no 9º dia (G6b) e quatro no 9º dia (G10b).

6.3 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE BAÇO DOS HAMSTERS PELA PCR-RFLP

Foram analisadas amostras de baço de 27 animais expostos às picadas de *Ny. whitmani* F1. Os resultados de amplificação da extração de DNA revelaram que os oligonucleotídeos LITSR e L5.8S foram capazes de detectar infecção por *Leishmania*.

Para confirmação da espécie de *Leishmania* foi realizada a PCR tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de aproximadamente 100 pb de *Leishmania* seguido da identificação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP), utilizando a enzima de restrição *Hae* III.

Após a restrição com a enzima foi possível identificar a infecção dos animais por *L. (L.) amazonensis* nos 27 hamsters expostos às picadas de fêmeas de *Ny. whitmani*, 100% dos animais foram positivos (Figura 18).

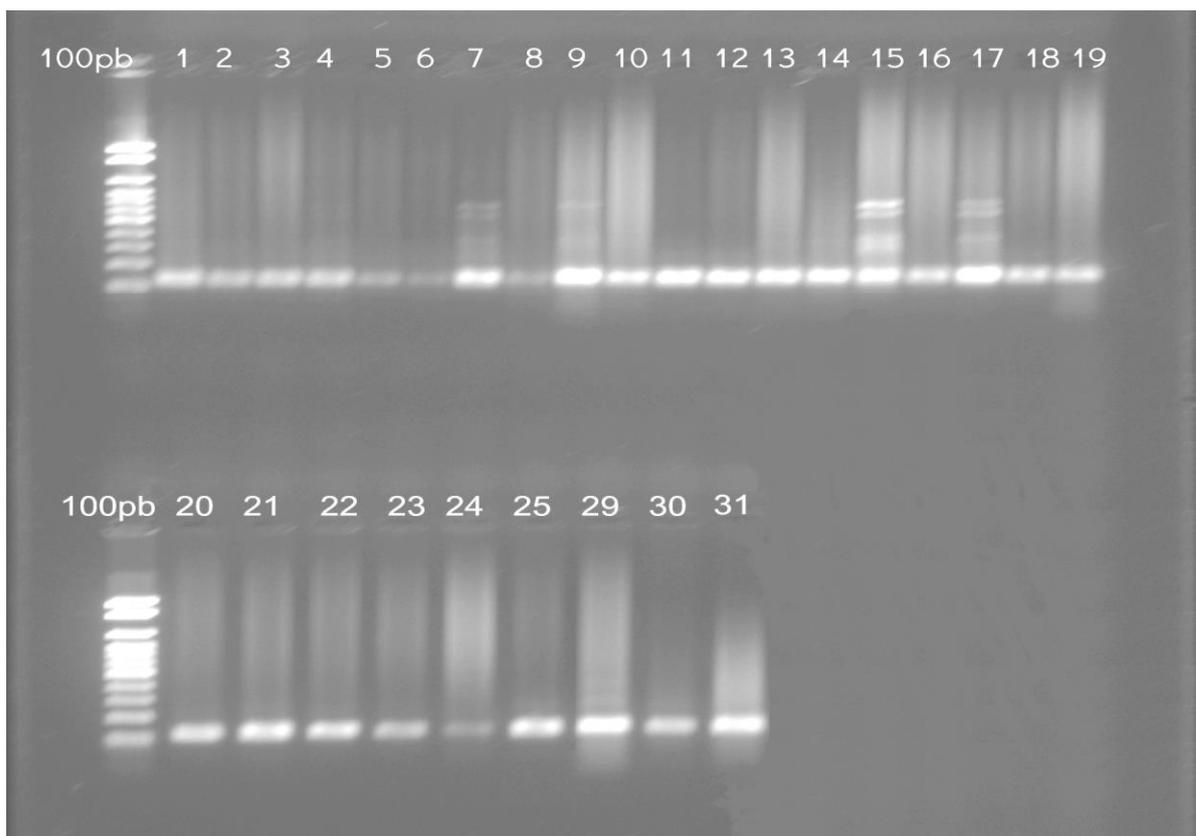


Figura 18. Amplificação da região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal ITS1 (SSU rRNA e 5.8S rRNA) de *L. (L.) amazonensis*. 1ª coluna: **marcador de 100 pb**. **Hamsters de 1 a 19; 30 e 31:** do experimento 2. **Hamsters de 20 a 25:** do experimento 1. **Controle positivo (29):** hamster infectado experimentalmente por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa R24.

7 DISCUSSÃO

A determinação de que a fêmea de flebotomíneo é capaz de infectar-se experimentalmente com *Leishmania* pressupõe a suspeita que na ausência do vetor específico, uma determinada espécie parasita (agente etiológico) pode ser transmitida por outro vetor competente com alta densidade na área. No Brasil, *L. (L.) amazonensis* é encontrada, principalmente na Bacia Amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias, tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), e também no Acre, Bahia, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Minas Gerais, Santa Catarina (LAINSON, 1997a, SILVEIRA *et al.*, 1997; MARZOCHI, 1992; BRASIL, 2010) e, no Mato Grosso do Sul (DORVAL *et al.*, 2006, 2009; NUNES *et al.*, 2008). Tem como principal vetor a espécie *Bichromomyia flaviscutellata*. No Amazonas e Rondônia, sendo transmitida pelos vetores *Bi. reducta*, *Bi. olmeca* e *Bi. flaviscutellata* (LAINSON, 1997a, SILVEIRA *et al.*, 1997; MARZOCHI, 1992).

Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, encontramos *Bi. flaviscutellata* presente em pocilga, galinheiro, borda e interior de mata em dois fragmentos de mata, Cohab II e Vila Mirella no período de 2008-2009, na cidade de Dourados, MS (dados ainda não publicados).

A especificidade flebotomíneo-*Leishmania* parece representar um relevante pré-requisito na identificação da espécie vetora. Entretanto, a suposta condição de especiação de *Leishmania* se relacionada a flebotomíneos neotropicais, sugere-se uma maior flexibilidade em sua especificidade, suportando o desenvolvimento de estirpes do subgênero *Leishmania* e/ou *Viannia* (WALTERS *et al.*, 1993).

De qualquer forma, neste estudo a localização das formas infectantes no tubo digestório de fêmeas de *Ny. whitmani* (F1) e a infecção por *L. (L.) amazonensis* nos hamsters corrobora como indicador de especificidade, devido facilitar a passagem do parasita ao hospedeiro vertebrado.

A transmissão do parasita via picada de fêmeas de flebotomíneos é considerada como prova conclusiva de característica vetorial, segundo KILLICK-KENDRICK e WARD (1981).

Com os resultados apresentados confirma-se que *Nyssomyia whitmani* pode infectar-se experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e é suscetível à infecção. Parece não haver dúvidas sobre a competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* e conclui-se que a espécie pode ser um vetor competente para a transmissão *L. (L.) amazonensis* e dispersor da leishmaniose cutânea difusa.

8 CONCLUSÕES

O estudo de competência vetorial com o estabelecimento de colônia de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em condições de laboratório, concluiu-se que:

A espécie *Nyssomyia whitmani* apresentou suscetibilidade experimental à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e sua transmissibilidade via picada em hamsters suscetíveis.

A competência vetorial de *Nyssomyia whitmani* em relação à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi demonstrada.

E apresenta-se uma nova técnica para a remoção e transferência dos ovos de flebotomíneos no estabelecimento de colônia em laboratório.

9 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J.A. 2010. Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2010. (Tese de doutorado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG).
- AÑEZ, N.; NIEVES, E.; CARLOZA, D. 1989. The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83:634-635.
- AGUIAR, G.M. & MEDEIROS, W.M. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. *In: Flebotomíneos do Brasil*, Rangel EF & Lainson R. Rio de Janeiro: Fiocruz. p.207-255.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; FORTES-DIAS, C.L.; COSTA, R.T.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. 2004. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, na endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 99:481-487.
- BARBOSA GM, MARZOCHI MCA, MASSARD CL, LIMA GPS, CONFORT EM. 1999. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 15:641-646.
- BRAGA-MIRANDA, L.C.; MIRANDA, M.; GALATI, E.A.B. 2006. Phlebotomine fauna in a rural area of Brazilian Pantanal. *Revista de Saúde Pública*, 40(2):324-326.
- BARRAL, A.; SAMPAIO, D.P.; GRIMALDI-JR, G. MOMEN, H.; PRATTE, D.M.M.; JESUS, A.M.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR, W. 1991. *Leishmania* in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal Tropical Medical Hygiene*, 44:536-546.
- BARRETO, M. P. Contribuição para o estudo da biologia dos flebotomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). 1942. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP. Tese.
- BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral americana. Brasília: Ministério da Saúde, 120p.
- BRASIL. 2010. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Ministério da Saúde, 180p.
- BRAZIL, R.P.; DE ALMEIDA, D.C.; BRAZIL, B.G.; MAMEDE, S.M.P.O.1991a. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia*, 33 (suppl.1):113-117.

BRAZIL, R.P.; MORTON, I.E.; WARD, R.D. 1991b. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (N.) whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Ceará State, Northeast Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 86:497-480.

BRAZIL, R.P. & OLIVEIRA, S.M.P. 1999. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). Medical Veterinary Entomology, 13:463-464.

BRAZIL, R.P. & BRAZIL, B.G. 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Flebotomíneos do Brasil, Rangel EF & Lainson R. Rio de Janeiro: Fiocruz. p.257-274.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C.; ANTUNES, J.L.F. 2002. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35(4):299-306.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; LIMA, A.C.V.M.R. & GONTIJO, C.M.F. 2008. *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 8:407-414.

CASANOVA, C.; COSTA, A.I.P. & NATAL, D. 2005. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 100:717-724.

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

CHANIOTIS, B. N. 1967. The biology of *California Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. Journal of Medical Entomology 4: 211-233.

CIPA GROUP. 1993. A programme for computer aided identification of phlebotomine sandflies of the America (Cipa) – presentation and check-list of American species. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 88(2):221-230.

COLMENARES, M.; PORTÚS, M.; BOTET, J.; DOBAÑO, C.; GÁLLEGO, M.; WOLFF, M. et al. 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a Competitive Enzyme Linked Immunosorbent. Journal Medical Entomology, 32:229-233.

CORTE, A.A.; NOZAWA, M.R.; FERREIRA, M.C.; PIGNATTI, M.G.; RANGEL, O.; LACERRA, S.S. 1996. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. Caderno Saúde Pública, 12(4):465-472.

COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; CECILIA, I.N.; OSAKI, N.K.M.; NETO, E.M.; TADA, M.S., et al. 1987. Aspectos psicossociais e estigmatizante na leishmaniose cutâneo-mucosa. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, 20:77-82.

COSTA, A.P. 2001. Estudo de fatores ambientais associados à transmissão da leishmaniose tegumentar americana através do sensoriamento remoto orbital e sistema de informação geográfica [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.

CUTOLO, A.A. & ZUBEN, C.J.V. 2008. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de cerrado no município de Corumbataí, centro-leste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1):45-49.

CHRISTENSEN, H.A. & HERRER, A. 1980. Panamanian *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) host attraction profiles. *Journal Medical Entomology*, 17:522-528.

DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO-FILHO, S.P. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48:151-156.

DEANE, L.M. & GRIMALDI Jr, G. 1985. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang JP, Bray RS (eds) *Leishmaniasis*. Elsevier, 247-281.

DEDET, J.P. 1993. *Leishmania* et leishmanioses du contiente américain. *Annales de L'Institute Pasteur*, 4 :3-25.

DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology e Infections Diseases*, 27:305-318.

DINIZ, M.M.C.S.L. ; OVALLOS, F.G. ; GOMES, C.M.C. ; LAVITSCHKA, C.O. & GALATI, E.A.B. 2014. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania amazonensis*. *Parasites & vectors*, 7 :2-11.

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

DORVAL, M.E.M.C; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; ALVES, T.P.; ALVES, M. A.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A.B.; CUNHA, R. V. 2009. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5):695-702.

DOUGALL, A.M, ALEXANDER, B.; HOLT D.C.; HARRIS, T; SULTAN A.H.; BATES P.A.; ROSE, K. WALTON S.F. 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal of Parasitology*, 41:571-579.

DOURADO, M.I.C.; NORONHA, C.V.; ALCANTARA, N.; ICHIHARA, M.Y.; LOUREIRO, S. 1989. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Revista Saúde Pública*, 23(1):2-8.

DUARTE, I.R.M.; ARRUDA, C.C.P.; ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; SOUZA, A.I.; DOURADO, D.M.; COSTA, S.C.G. 2010. Comportamento biológico de *Leishmania (L.) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 39(1):33-40.

DYE, C.; DAVIES, C.R. & LAINSON, R. 1991. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Animal Behaviour*, 42:183-192.

ELNAIEM, D.A.; MORTON, I.; BRAZIL, R.P.; WARD, R. 1992. Field and laboratory evidence for multiple blood feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Medical Veterinary Entomology*, 6(2):173-174.

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

FERNANDES, M.F.; SANTOS, K.M.; FERREIRA-JUNIOR, J.S.; SILVA, R.A.; VERLINDO, A.C.; STEFANELI, M.; ISHIMI, C.M.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; GALATI, E.A.B.; LOPES, C.C.S.; PEREES, L.L.S.; MEIRA, R.O.; ANDRADE FILHO, J.D.; CAMPOS, J.G.; FERNANDES, W.D.; RAIZER, J. 2011. Phlebotomine fauna in Forest and anthropic area, Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 7 ISOPS – International Symposium on Phlebotomine Sandflies, 25-30 April Kusadasi – Turkey.

FORATTINI, O. P. *Entomologia médica*. 1962. São Paulo: Edgard Blücher / Edusp, v. 4, 658p.

FORATTINI, O.P. 1973. *Entomologia médica*. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp, v.4, 658p.

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

GALATI, E.A.B. 2003. Morfologia e taxonomia. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (orgs.). Rio de Janeiro: Fiocruz, p.23-51. 367p.

GALATI, E.A.B. 2014. *Classificação de Phlebotominae*. Apostila da disciplina HEP 5752 do Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública. São Paulo, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública/USP.<www.fsp.usp.br/~egalati>.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M.A.; ROCHA, H.C.; GARCIA, W.B. 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 30(2):115-128.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.M.C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; GONÇALVES-ANDRADE, R.M.; NAUFEL, G. 2001. Attractiveness of Black Shannon Trap for Phlebotomines. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5):641-647.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. 2003. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 32(2):235-261.

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

GALATI, E.A.B.; MARASSÁ, A.M.; FONSECA, M.B.; GONÇALVES-ANDRADE, R.M.; CONSALES, C.A.; BUENO, E.F.M. 2010. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 3. Serra district – area of hostels for tourists who visit the Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 54(4):665-676.

GOMES, A.C.; BARATA, J.M.S.; ROCHA E SILVA, E.O.; GALATI, E.A.B. 1989. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil (1). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31(1):32-39.

GOMES, A.C. 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Ann. Bras Dermatol*, 67:55-60.

GOMES, A.C. & CAMARGO-NEVES, V.L.F. 1998. Estratégias e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31:553-558.

GONTIJO, C.M.F.; COELHO, M.V.; FALCÃO, A.R.; FALCÃO, A.L. 1987. The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 82(3):445.

GRIMALDI Jr, G. & TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 6:230-250.

HERTIG, M. & JOHNSON, P. T. 1961. The rearing of *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). I – Technique, *Ann. Ent. Soc. Am.*, 54: 753-764.

IBGE. 2014. Fundação Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia. Disponível em<<http://www.ibge.gov.br/>>.

JACOBSON, R.L.; SCHLEIN, Y.; EISENBERGER, C.L. The biological function of sand fly and *Leishmania* glycosidases. *Medical Microbiology Immunology*, 190:51-55

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

KAMHAWI, S.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; PHAM, V.M.; KUMAR, S.; LAWYER, P.G.; TURCO, S.J.; BARILLAS-MURY, C. ; SACKS, D. & VALENZUELA, J.G. 2004. A role for insect Galectins in Parasite Survival. *PpGalec Mediates*, 119:329-341.

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

KILLICK-KENDRICK, R. & WARD, R.D. 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology*, 82:143-152.

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

KILLICK-KENDRICK, R.; TANG, Y.; JOHNSON, R.N.; NGUMBI, P.M.; ROBERT, L.L. 1997. Phlebotomine sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). V. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *meireillae* n.sp. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91(4):417-428.

KILLICK-KENDRICK, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17:279-289.

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

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987a. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press. 1:1-120.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987b. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, 273:595-599.

LAINSON, R. 1997a. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 92(3):377-387.

LAINSON, R. 1997b. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*, 11(1): 29-40.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 2005. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin, D. (org.) *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. London: Arnold, p.313-349.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 89:435-443.

LANE, R.P.; PILE, M.M. & AMERASINGHE, P. 1990. Anthoropophagy and aggregation behavior of the sandfly *Phlebotomus argentipes* in Sri Lanka. *Medical and Veterinary Entomology*, 4:79-88.

LEHANE, M.J. 1991. *Biology of blood-sucking insects*. London: Harper-Collins Academic, 288p.

LEWIS, D.J. & DOMONEY, C.R. 1966. Sugar meals in Phlebotomine and Simuliidae. Proceeding of the Royal Entomological Society of London, 1:175-179.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRI, E.A.; DEREURE, J.; PRATLONG, J.; DEDET, A.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL. 2000. V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 94:623-631.

MARCONDES, C.B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. Entomological News, 118(4):351-356.

MARCONDES, C.B. 2011. Entomologia médica e veterinária. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 526p.

MARSDEN, P.D. 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia, Brasil. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, 27:93-101.

MARZOCHI, M.C.A. 1989. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Grandes Endemias Brasileiras. Editora Universidade de Brasília, DF.

MARZOCHI, M.C.A. 1992. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). JBM, 63(6):81-105.

MIRANDA, C.; MASSA, J.L.; MARQUES, C.C.A. 1996. Análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. Revista Saúde Pública, 30(5):433-437.

MISSAWA NA, LOROSA ES, DIAS ES. 2008. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(4):365-368.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R. & WILSON, M.L. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at na endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. Journal Medical Entomology, 30:427-435.

MORENO, J. & ALVAR, J. 2002. Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology, 18(9):399-405.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. Lancet, 366(9496):1561-1577.

MYSKOVA, J.; SVOBODOVA, M.; STEPHEN, M.; BEVERLEY, S.M.; VOLF, P. A. 2007. Lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbiology Infection, 9:317-324.

NASCIMENTO, J.C; PAIVA, B.R.; MALAFRONTA, R.S.; FERNANDES, W.D.; GALATI, E.A.B. 2007. Natural infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 49(2):119-122.

NATAL, D.; MARUCCI, D.; REIS, I.M. GALATI, E.A.B. 1991. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). *Revista Brasileira de Entomologia*, 35:697-700.

NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; CASRO, K.R.R.; SVERSUTTI, A.C.D.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. 2008. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(1):17-22.

NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; NOGUCHI, R.C.; ARÃO, L.B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M.A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C.; SERAFINI, L.N.; SANTOS, D. 1995. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – Estudos na população humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28(3):185-193.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CARDOZO, C.; ROCCA, M.E.G.; ANDRADE, A.R.O.; SANTOS, M.F.C.; AQUINO, R.B.; ROSA, D. 2008. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3):446-451.

NGUMBI, P.M.; LAWYER, P.G.; JOHNSON, R.N.; KIILU, G.; ASIAGO, G. 1992. Identification of Phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical Veterinary Entomology*, 6:385-388.

OGOSUKU, E.; PEREZ, J.E.; PAZ, L.; NIETO, E.; MONJE, J. & GUERRA, H. 1994. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. In Peru. *Annals Tropical Medical Parasitology*, 88:329-335.

OLIVEIRA, S.M.P.; AFONSO, R.C.; DIAS, C.M.G.; BRAZIL, R.P. 1994. Description of a new species of sandfly *Lutzomyia (P) mamedei* (Diptera: Psychodidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 89:319-320

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. 2001. A new sand fly, *Lutzomyia campograndensis* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3):325-329.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. 2003. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Caderno de Saúde Pública*, 19(4):933-944.

OLIVEIRA, G.A.; GALATI, E.A.B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, G.R.; ESPÍNDOLA, I.A.C.; DORVAL, M.E.M.C.; BRAZIL, R.P. 2006. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 101(8):869-874.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N.; REBÊLO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; PEREIRA, S.R.F. 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodiade, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(6):540-543.

PAIVA, B.R.; PASSOS, L.N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTA, R.S.; ANDRADE JUNIOR, H.F. 2004. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo, 46(6):335-338.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C.; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JR, H.F.; MALAFRONTA, R.S. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies base non mini-exon gene PCR. Acta Tropica, 99:252-259

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

PAIVA, B.R.; OLIVEIRA, A.G.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; MALAFRONTA, R.S. 2010. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Revista Acta Tropica, 2(13):1-5.

PAULA, C.C.; FIGUEIREDO, F.B.; MENEZES, R.C.; MOUTA-CONFORT, E.; BOGIO, A.; MADEIRA, M.F. 2009. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. Revista Brasileira de Medicina Tropical, 42(1):77-78.

PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO, N.F.C.; BLANCO, E.E.N. 2003. Interação Vetor-Hospedeiro: Interação *Leishmania*-Hospedeiro invertebrado. In: Flebotomíneos do Brasil, Rangel E.F. & Lainson, R. (orgs.). Rio de Janeiro: Fiocruz. p.275-289.

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

RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 80(2):219-226.

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

RANGEL, E.F.; AZEVEDO, A.C.R.; LIMA, J.B.; SOUZA, N.A.; PEREIRA, T.; MENEZES, C.R.V.; COSTA, V.A. 1999. Ecologia da leishmaniose cutânea no estado do Mato Grosso. I. Distribuição Vertical da Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 32(suppl. 1):1-25.

RANGEL, E.F. & LAINSON, R. 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Flebotomíneos do Brasil, Rangel E.F. & Lainson, R. (orgs.). Rio de Janeiro: Fiocruz. p.291-309.

RANGEL, E.F. & LAINSON, R. 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 104:937-954.

READY, P.D. 1979. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal Medical Entomology*, 16:413-423.

ROBERTS, D.R. & HIS, B.P. 1979. An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environmental Entomology*, 8(6):1007-1013.

ROGERS, M.E.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. 2001. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania Mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124:495-507.

ROGERS, M.E.; BATES, P.A. 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 3(6) e 91. Doi.10.1371/journal.ppat.0030091.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1987. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará state, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis* in the Serra dos Carajá. *Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 81:353-355.

SANTOS, M.F.C. 2007. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia almerioi* Galati & Nunes, 1999 para três espécies de *Leishmania*: *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Campo Grande, 2007. 44f. [Dissertação de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal/UNIDERP].

SACKS, D.L. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Parasitology*, 69:100-103.

SANTOS, K.M.; FERNANDES, M.F.; DORVAL, M.E.C.; STEFANELI, GALATI, E.A.B.; FERNANDES, W.D.; HARTKOPF, A.C.L.; FILIPPIN, K.J.; COSTA-LIMA JUNIOR, M.S.; GAONA, J.C. 2013. INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM ÁREA INDÍGENA DO MUNICÍPIO DE DOURADOS, MATO GROSSO DO SUL. Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campo Grande-MS, agosto, 2013.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J.; SILVA, S.O.; ANDRADE, A.S.R.; MELO, M.N. 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8):1033-1039.

SAVANI, E.S.M.M.; GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; CASTILHO, T.M.; CAMARGO, C.O.; D'ÁRIA, S.R.N.; FLOETER-WINTER, L.M. 2005. Natural infection in sand fly vectors in cutaneous and visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Archives de L' Institut Pasteur de Tunis*, 82:48-49.

SAVANI, E.S.M.; NUNES, V.L.B. ; GALATI, E.A.B. ; CASTILHO, T.M. ; ZAMPIERI, R.A. ; FLOETER-WINTER, L.M. 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia*

longipalpis naturally infected by *Leishmania* spp.: In a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 160:18-24.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. 1994. Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by platin feeding of the sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50:20-27.

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

SHANNON, R. 1939. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *American Journal of Tropical Medicine*, 19:131-148.

SHAW, J.J. 2002. New World Leishmaniasis: The ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrel, J.P. (ed.) *World Class Parasites: Leishmania*. London: Kluwer Academic Publishe, cap. 2, p.11-32.

SHERLOCK, I.A. 2003. Importância Médico Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (org.) Rio de Janeiro: Fiocruz. p.15-22.

SHIMABUKURO, P.H.F. & GALATI, E.A.B. 2011. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropical*, 11(supl. 1):685-704.

SILVA, A.C. & GOMES, A.C. 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(2): 187-191.

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

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M. 1997. Leishmaniose tegumentar americana. In: Leão R.N.Q. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônica*. Belém: CEJUP.

SINAN (Município). Coordenadora Municipal de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde de Dourados-MS, 2014a.

SINAN (Estado). Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, 2014b.

TESH, R.B.; GUZMAN, H.; WILSON, M.L. 1992. Trans beta farnasene as feeding stimulant for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 19:226-231.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; LONARDONI, M.V.C; SILVEIRA, T.G.V. 2006. Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. Revista de Saúde Pública, 40(2):327-330.

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H.H.; ELIAS, C.R. & LAROSA, R. 2001. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Revista Instituto Adolfo Lutz, 60(1):47-51.

VERLINDO, A.C.; FERNANDES, M.F.; PERES, L.L.S.; MEIRA, R.O.; STEFANELI, M.; SANTOS, K.M.; ISHIMI, C.M.; SANTOS, M.F.C.; FERREIRA, A.M.T.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; OSHIRO, E.T.; ANDRADE FILHO, J.D.; RAIZER, J.; FERNANDES, W.D.; OLIVEIRA, A.G. 2011. Primeiro relato de infecção por *Leishmania infantum chagasi* em *Nyssomyia whitmani* e *Psathyromyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) em Mato Grosso Sul, Brasil. 3º Congresso do Centro Oeste – Doenças Infecciosas Emergentes, Reemergentes e Negligenciadas, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

VEXENAT, J.A; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. 1986. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínea. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81(3):293-301.

VOLF, P. & MYSKOVA, J. 2007. *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trend Parasitology, 23:91-92.

YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. 1994. Guide to the identification and geographical distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs American Entomological Institute. 881p.

WALTERS, L.L. & MODI, G.B. 1989. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 41:295-317.

WALTERS, L.L.; IRONS, K.P.; CHAPLIN, G.; TESH, R.B. 1993. Life cycle of *Leishmanai major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology, 30:699-718.

WALLTON, B.C.; SHAW, J.J.; LAINSON, R. 1977. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. Journal of Parasitology, 63:1118-1119.

WARBURG, A. et al. 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 345(1312):23-230.

WARD, R.D.; MORTON, I.A; BRAZIL, R.P.; TRUMPER, S. & FALCÃO, A.L. 1990. Preliminary laboratory and field trials of a heated pheromone trap for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 85:445-452.

WATERSTON, J. 1922. A contribution to the knowledge of bionomics of sandflies. Ann. Trop. Med. Parasit., 16:69-92.

WILLIAMS, 1970. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 64:317-368.

WHO. 2014. (<http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>).

ANEXO 1 – PROTOCOLO Nº 001/2013 - CEUA/UFGD



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 21 do março de 2013

Senhora Pesquisadora:

Magda Freitas Fernandes

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **001/2013 – CEUA/UFGD** - intitulado "**Competência vtorial de *Nyssomyia whitmani* e *Pintomyia pessoai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*" foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.**

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.


Felipe de Almeida Borges
Secretário CEUA/UFGD

Felipe de Almeida Borges
Assessoria em Administração
B.A.F.B. - 000036

CAPÍTULO 2

Manuscrito 1: Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em fragmentos de mata em área urbana e infecção natural de *Nyssomyia whitmani* por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Periódico: Revista Brasileira de Entomologia (a submeter).

Fauna Flebotomínea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em Fragmentos de Mata em Área Urbana e Infecção Natural de *Nyssomyia whitmani* por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Cassiana Miki Ishimi¹, Magda Freitas Fernandes¹, Kleiton Maciel dos Santos¹, Lucas Lopes da Silveira Peres¹, Aline Etelvina Casaril⁴, Elisa Teruya Oshiro⁵, Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval⁵, Fábio Juliano Negrão³, Wedson Desidério Fernandes², Alessandra Gutierrez de Oliveira⁵, Eunice Aparecida Bianchi Galati⁶.

1. Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum Km 12 – Cidade Universitária, CEP 79804-070, Dourados, MS, Brasil. email: cassianaishimi@gmail.com; magdamattosfer@gmail.com; kleitomaci@gmail e lucaslperes@gmail.com

2. Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum Km 12 – Cidade Universitária, CEP 79804-070, Dourados, MS, Brasil. email: wedsonfernandes@ufgd.edu.br

3. Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum Km 12 – Cidade Universitária, CEP 79804-070, Dourados, MS, Brasil. email: fabionegrao@ufgd.edu.br

4. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. email: alinecasaril@msn.com

5. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária s/n, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. email: elisa.teruya.oshiro@gmail.com; elizabeth.dorval@ufms.br e alessandra.oliveira@ufms.br

6. Faculdade de Saúde Pública (FSP), Universidade de São Paulo (USP). Av. Dr Arnaldo, 715, CEP 01246-904, São Paulo, SP, Brasil. email: egalati@usp.br

Autor correspondente: Magda Freitas Fernandes. email.: magdamattosfer@gmail.com

RESUMO

Dourados, Mato Grosso do Sul, região intermediária entre o Cerrado e a Mata Atlântica, dois biomas de importância na epidemiologia das leishmanioses, tendo os flebotomíneos como vetores de agentes de *Leishmania*. O objetivo da pesquisa foi identificar a fauna flebotomínea em ecossistemas florestais urbanos no município de Dourados para conhecer a abundância das espécies e a infecção natural por *Leishmania* spp.. Foi amostrado 10 fragmentos de matas, utilizando armadilhas automáticas luminosas, tipo Falcão; instaladas mensalmente, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. Fêmeas de flebotomíneos foram dissecadas para identificação e observação de flagelados no tubo digestório e submetidas à análise molecular para identificação do agente etiológico. A fauna flebotomínea constituiu-se de 18 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia galindoi*, *Brumptomyia pintoii*, *Evandromyia cortelezzi*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia bigeniculata*, *Pintomyia christenseni*, *Pintomyia misionensis*, *Pintomyia pessoai* e *Sciopemyia sordellii*. As espécies mais abundantes foram *Nyssomyia whitmani*, *Brumptomyia brumpti*, *Psathyromyia aragaoi* e *Pintomyia pessoai*. A pesquisa confirmou a presença de vetores de agentes de leishmanioses tegumentar e visceral nos fragmentos de matas na área urbana e, *Nyssomyia whitmani* foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania (Leishmania) infantum*. A participação da espécie na transmissão de leishmaniose tegumentar é conhecida no Brasil e em outros países da América do Sul, no entanto, em relação à leishmaniose visceral, apesar de ter sido encontrada naturalmente infectada pelo parasita, mais investigações são necessárias para demonstrar sua capacidade e competência vetorial.

Palavras-chaves: Florestas, Leishmanioses, Parasitas, Vetores.

INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Forattini 1973); cujas fêmeas praticam hematofagia. Constituem um grupo de grande interesse em saúde pública e estão distribuídos por todo o mundo, sendo mais abundantes na Região Neotropical. São conhecidas aproximadamente 500 espécies (Galati 2013) e cerca de 60 delas estão implicadas, suspeitas ou comprovadas, na veiculação de *Leishmania* (Killick-

Kendrick 1990, Dedet 1993, Santos et al. 1998, Cipa Group 1999; Galati 2003, Sherlock 2003).

Esses dípteros são encontrados com frequência em ecótopos naturais, como troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, frestas em rochas e cavernas (Azevedo et al. 1993, Galati et al 2003a, 2003b, 2006), assim como, em ambientes rurais e urbanos, próximos a animais domésticos e habitações humanas, demonstrando que se encontram em processo de adaptação (Tolezano et al 2001, Barata et al 2004). Isto vem ocorrendo devido à diminuição das matas nativas, com alteração dos habitats naturais e restrição dos ambientes utilizados por esses vetores. Essas alterações ambientais ocasionadas pelo homem também levaram à dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos flebotomíneos, inclusive o antrópico (Gomes et al 1989, Marzochi 1989, Tolezano et al 2001).

Desse modo, aquelas espécies que de alguma forma resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (Forattini et al 1976, Oliveira et al 2006). Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas e representam um risco constante com vetores de *Leishmania*, podendo manter o ciclo de transmissão entre os animais domésticos e humanos (Vexenat et al 1986, Barbosa et al 1999). Essa proximidade do homem a áreas de matas e a criação de animais domésticos tem atraído grande número de espécies de flebotomíneos (Missawa et al 2008) e, explica em grande parte, a persistência das leishmanioses nesses ambientes (Lima et al 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil, em 10 fragmentos de mata em área urbana. O relevo é plano com suaves ondulações, e encontra-se a uma altitude média de 430,49 m. O clima no verão é tropical e úmido e no inverno tropical seco. O tipo de solo é o latossolo vermelho distroférico e distrófico. A vegetação predominante é do tipo Savana (Cerrado), IBGE (2014).

Os pontos de coleta, os 10 fragmentos de mata: M1 (Guaicurus) localiza-se próximo ao bairro Parque das Nações II; M2 (Irmãos Maristas), próximo ao bairro João Paulo II; M3 (Horto Florestal), próximo ao bairro Canaã II que faz parte do Horto; M4 (Vila Almeida), bairro Vila Almeida; M5 (Novo Horizonte), ponto próximo ao bairro Novo Horizonte e Jardim Flórida II, rodeado por residências e em 2010 foi construído um conjunto habitacional

a 20 metros do fragmento de mata; M6 (Chácara Caiuás), ponto próximo ao bairro Caiuás, divisa com a reserva indígena, aldeia Jaguapiru; M7 (Monte Alegre), próximo ao bairro Jardim Monte Alegre, também em 2010 foi construído um condomínio de luxo e foi finalizada a construção no anel viário, que também faz divisa com área indígena; M8 (Chácara Flora), ponto próximo ao bairro chácara Flora; M9 (Mosteiro), ponto onde fica o Mosteiro Santa Maria dos Anjos, Irmãs Clarissas e próximo ao bairro Parque Alvorada; M10 (Primaveras), ponto próximo ao Jardim das Primaveras, onde foi construído em 2009 um conjunto habitacional com residências a menos de 50 metros da borda da mata (Figura 1).

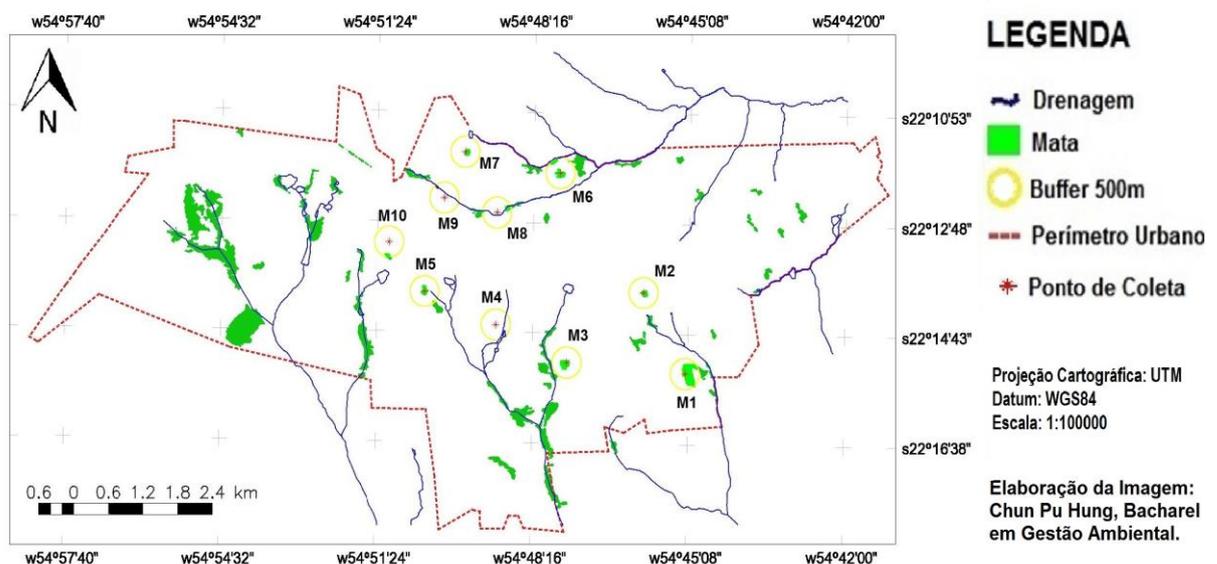


Figura 1. Área urbana do município de Dourados. Pontos de coleta de flebotomíneos, fragmentos de matas inseridas dentro do raio de 500 metros. Material produzido a partir das imagens do satélite CBERS 2B, sensor CCD, órbitas ponto 136/125, com o emprego das bandas 2, 3 e 4, datada de 21 de abril de 2009; e sensor HRC, órbitas ponto 163D_125, data de 07 de janeiro de 2009, com o uso do Programa *Spring*.

PERÍODO ESTUDADO

O levantamento da fauna flebotomínea e a investigação por infecção natural por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* foi realizado no período de novembro de 2010 a outubro de 2011.

PESQUISA ENTOMOLÓGICA

Os flebotomíneos foram coletados utilizando-se duas armadilhas automáticas luminosas, tipo Falcão instaladas no interior das matas, das 18h às 7h do dia seguinte; em

média, a um metro de altura (nível de solo) e a quatro metros de altura (nível de copa), uma vez ao mês, sem obedecer ao horário de verão.

Os machos foram submetidos ao processo de clarificação e diafanização em hidróxido de potassa a 10% para identificação das espécies e, as fêmeas foram dissecadas para confirmação da espécie mediante aspecto morfológico das espermatecas e outros caracteres para a diagnose e pesquisa de formas flageladas no tubo digestório.

As fêmeas dissecadas foram acondicionadas individualmente e em *pools* de no máximo 10 indivíduos por espécie, considerando-se o ecótopo (solo e copa) e fragmento de mata, em tubos cônicos de polietileno de 1,5 mL com álcool isopropílico para diagnóstico da espécie de *Leishmania* por meio da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR-).

A nomenclatura adotada para identificação das espécies de flebotomíneos segue a padronização de Galati (2003, 2014) e a abreviação dos gêneros, a de Marcondes (2007).

INFECÇÃO NATURAL

Para a detecção de infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos foi realizada análise molecular pela PCR para identificação de protozoários do gênero *Leishmania*.

Para as extrações do DNA de *Leishmania* os espécimes foram triturados com auxílio de pistilo plástico em tubos de 1,5 mL em 300µL da solução de resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories) a 5%. A solução foi misturada com ajuda de *vortex* por 15 segundos e posteriormente centrifugada por 20s a 13.000 rpm. Foi deixada em banho-maria a 80°C por 30 minutos e após este tempo o procedimento foi repetido. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo cônico de polietileno e, congelado a -20°C por um mês (Loxdale & Lushai 1998).

A análise molecular por meio da PCR foi realizada tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS1) de 350 a 360 pb de *Leishmania*. Para um volume final de 25µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 5,5 µL de água (mili Q autoclavada); e 1 µL de cada oligonucleotídeo LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') e 5 µL de amostra, segundo El Tai et al (2000).

As condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 95°C e 53°C por 30 segundos, 72°C por um minuto, com pós-extensão a 72°C por cinco

minutos, em termociclador. Como controle negativo foi utilizado uma reação com água e controle positivo DNA extraído de cão positivo para *Le. (Le.) infantum*. As amplificações foram por eletroforese em gel de agarose a 1,5% tendo como marcador inicial 100 pb e corados com gel red® e visualizados sob luz ultravioleta, com filtro de 300 nm.

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Os produtos das PCRs foram submetidos à digestão com enzima de restrição Hae III (isolada de *Haemophilus aegyptius*), que cliva fragmentos nos segmentos onde têm a sequência 5'...GG▼CC...3' ou 3'...CC▲GG...5'.

Foi adicionado 2µL de buffer 10x, uma unidade (0,5µL) de enzima Hae III, 5µL de DNA da PCR, completando-se o volume de 12,3µL com água ultrapura. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria a 37°C por três horas. Após esse período, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tampão TBE por três horas.

A enzima Hae III foi capaz de clivar o DNA da *Leishmania* em bandas com 120, 80 e 40 pb, possibilitando a identificação da espécie *L. (L.) infantum*, conforme descrito por Schönian et al. 2003.

RESULTADOS

FAUNA FLEBOTOMÍNEA

Foram coletados 589 espécimes de flebotomíneos, 305 (51,8%) machos e 284 (48,2%) fêmeas. A razão macho/fêmea foi de 1,07:1.

A fauna flebotomínea constitui-se de 18 espécies: *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia galindoi*, *Brumptomyia pinto*, *Evandromyia cortelezii*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia termitophila*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Micropygomyia acanthopharynx*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia aragaoi*, *Psathyromyia campograndensis*, *Psathyromyia bigeniculata*, *Pintomyia christenseni*, *Pintomyia misionensis*, *Pintomyia pessoai* e *Sciopemyia sordellii* (Tabela 1).

A subtribo que contribuiu com o maior número de espécies foi Lutzomyiina com nove espécies: *Ev. cortelezii*, *Ev. lenti*, *Ev. termitophila*, *Lu. longipalpis*, *Mg. migonei*, *Pi. christenseni*, *Pi. misionensis*, *Pi. pessoai* e *Sc. sordellii*, seguida de Brumptomyiina: *Br. brumpti*, *Br. cunhai*, *Br. galindoi* e *Br. pinto* e Psychodopygina: *Ny. whitmani*, *Pa. aragaoi*,

Pa. campograndensis e *Pa. bigeniculata* com quatro espécies cada uma e Sergentomyiina: *Mi. acanthopharynx* com uma espécie. Destas, subtribos, Psychodopygina contribuiu com a grande maioria de espécimes, num total de 326 (55,3%).

Ny. whitmani esteve presente em sete dos 10 fragmentos de mata amostrados e foi a espécie mais abundante, IAEP de 0,71 seguida de *Br. brumpti* e *Pa. aragaoi* com 0,67 e *Pi. pessoai* com 0,56. A maior diversidade ocorreu na mata Monte Alegre (M7) com 14 espécies, seguida pela mata Chácara Caiuás (M6) com 10 espécies, mata Guaicurus (M1) e a mata Irmãos Maristas (M2) com nove espécies.

Micropygomyia acanthopharynx e *Pintomyia misionensis*, espécies assinaladas pela primeira vez no município de Dourados, Mato Grosso do Sul.

As espécies *Ny. whitmani* e *Pa. aragaoi*, as duas mais abundantes estiveram presentes em todos os meses e, *Pi. pessoai* e *Mg. migonei*, espécies vetoras de leishmaniose tegumentar, ausentes apenas nos meses de março, junho e julho (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição mensal das espécies de flebotomíneos, no período de novembro de 2010 a outubro de 2011.

Espécies	Ano												Geral	
	2010						2011							
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	Total	%
<i>Br. brumpti</i>	19	5	11	5	7	7	2	2	-	-	2	6	66	11,21
<i>Br. cunhai</i>	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,85
<i>Br. galindoi</i>	23	4	1	-	-	1	1	1	-	-	1	2	34	5,77
<i>Br. pinto</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	2	0,34
<i>Ev. cortelezzii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	5	0,85
<i>Ev. lenti</i>	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	4	0,68
<i>Ev. termitophila</i>	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	4	0,68
<i>Lu. longipalpis</i>	-	-	1	-	-	-	5	-	-	1	-	-	7	1,19
<i>Mg. migonei</i>	8	3	4	18	-	10	1	-	-	6	7	9	66	11,21
<i>Mi. acanthopharynx</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,17
<i>Ny. whitmani</i>	17	1	10	10	8	34	21	21	3	26	63	21	235	39,90
<i>Pa. aragaoi</i>	21	7	14	1	2	6	5	2	1	1	2	3	65	11,04
<i>Pa. campograndensis</i>	1	-	5	-	-	-	2	-	1	-	1	2	12	2,04
<i>Pa. bigeniculata</i>	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	4	6	14	2,38
<i>Pi. christenseni</i>	4	3	1	2	2	-	1	-	-	1	-	2	16	2,72
<i>Pi. misionensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2	0,34
<i>Pi. pessoai</i>	4	4	4	2	-	1	2	-	-	4	22	7	50	8,49
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,17
Total													589	100

A distribuição mensal de *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai* (Figura 2), espécies incriminadas na transmissão de leishmaniose tegumentar, em relação às médias mensais de umidade relativa do ar (%), temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm) e a distribuição de *Lu. longipalpis*, principal vetor de leishmaniose visceral no Brasil, no período de novembro de 2010 a 2011 (Figura 3).

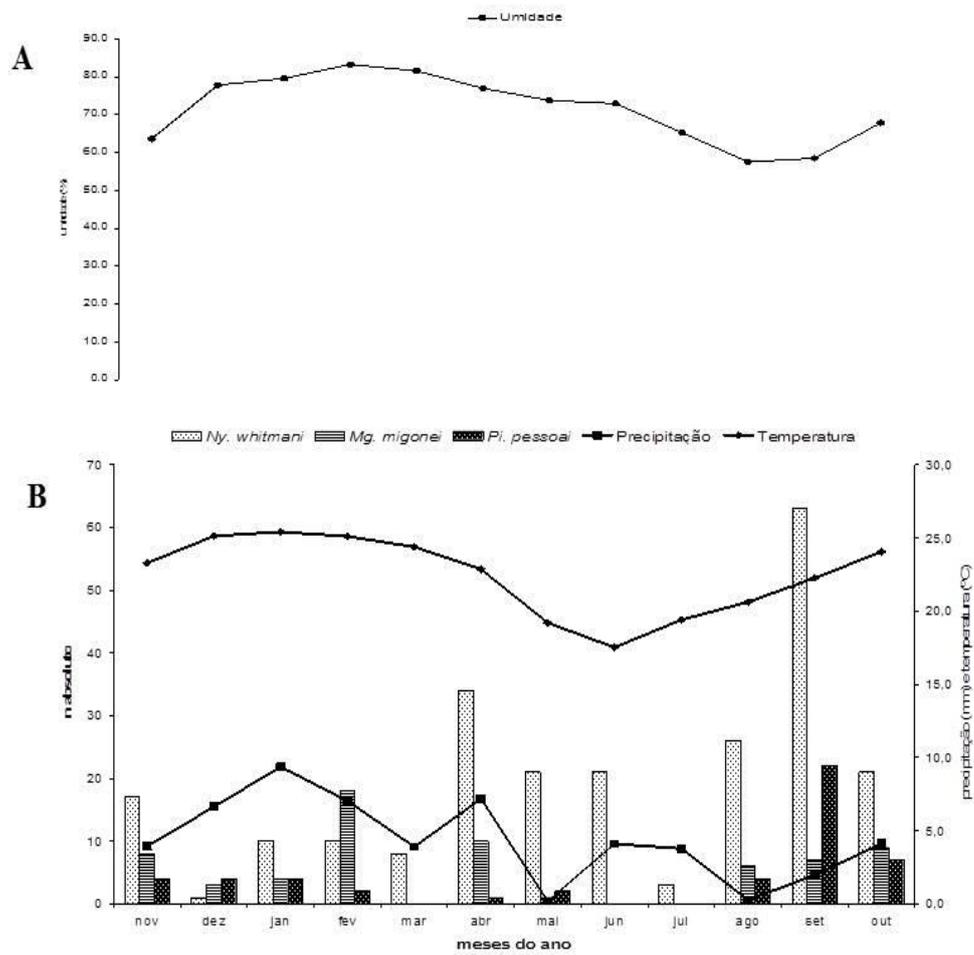


Figura 2. Distribuição mensal das espécies *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai*. **A.** Médias mensais de umidade relativa do ar (%). **B.** Número total de indivíduos com as médias mensais de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), no período de novembro de 2010 a novembro de 2011.

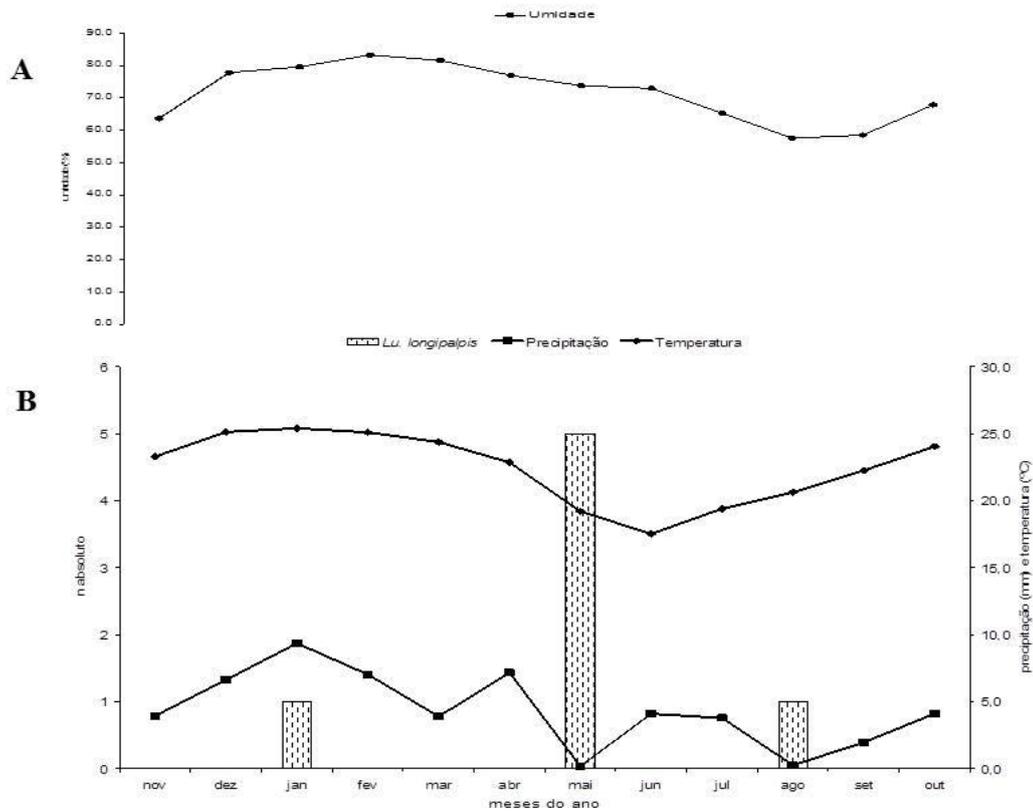


Figura 3. Distribuição mensal da espécie *Lu. longipalpis*. **A.** Médias mensais de umidade relativa do ar (%). **B.** Número total de indivíduos com as médias mensais de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), no período de novembro de 2010 a novembro de 2011.

INFEÇÃO NATURAL

Foram analisadas 284 fêmeas de flebotomíneos, distribuídas em 16 espécies: *Br. brumpti* (37), *Br. cunhai* (03), *Br. galindoi* (19), *Ev. cortelezzii* (03), *Ev. lenti* (02), *Ev. termitophila* (04), *Lu. longipalpis* (03), *Mg. migonei* (36), *Ny. whitmani* (88), *Pa. aragaoi* (47), *Pa. campograndensis* (07), *Pa. bigeniculata* (05), *Pi. christenseni* (16), *Pi. misionensis* (01), *Pi. pessoai* (12) e *Sc. sordellii* (01).

As fêmeas foram separadas de acordo com a data de coleta e o ecótopo em 52 *pools* de 2 a 10 indivíduos e 119 individualizadas.

Os resultados de amplificação da PCR revelaram que os oligonucleotídeos LITSR e L5.8S detectaram infecção por *Leishmania* em uma amostra de *Ny. whitmani*, que apresentou amplificação de 350 pb a 360 pb (Figura 4).

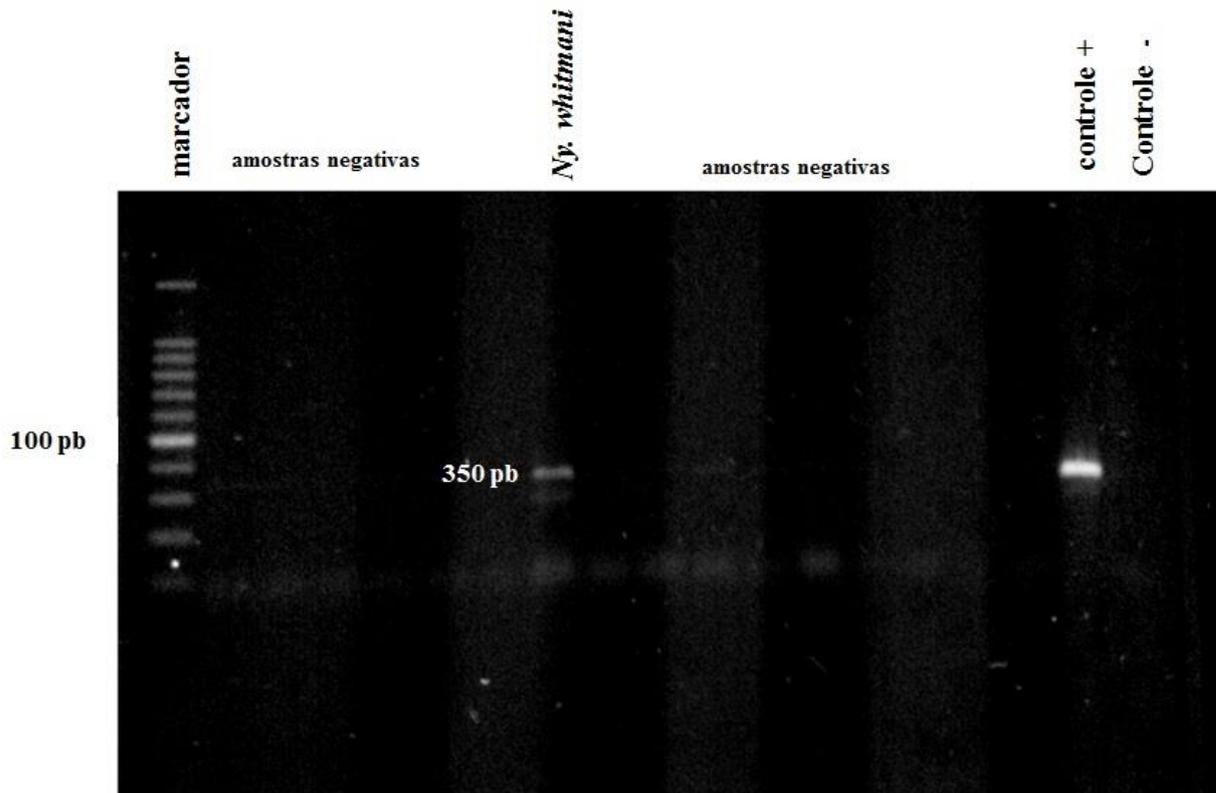


Figura 4. Resultado da amplificação pela PCR – oligonucleotídeos LITSR e L5.8S de *Ny. whitmani* (amostra individualizada) com infecção natural por *Leishmania* spp.

E os resultados pela PCR-RFLP o agente etiológico *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* em *Ny. whitmani* com 180 pb e os fragmentos menores 50 pb e 20 pb (Figura 5).

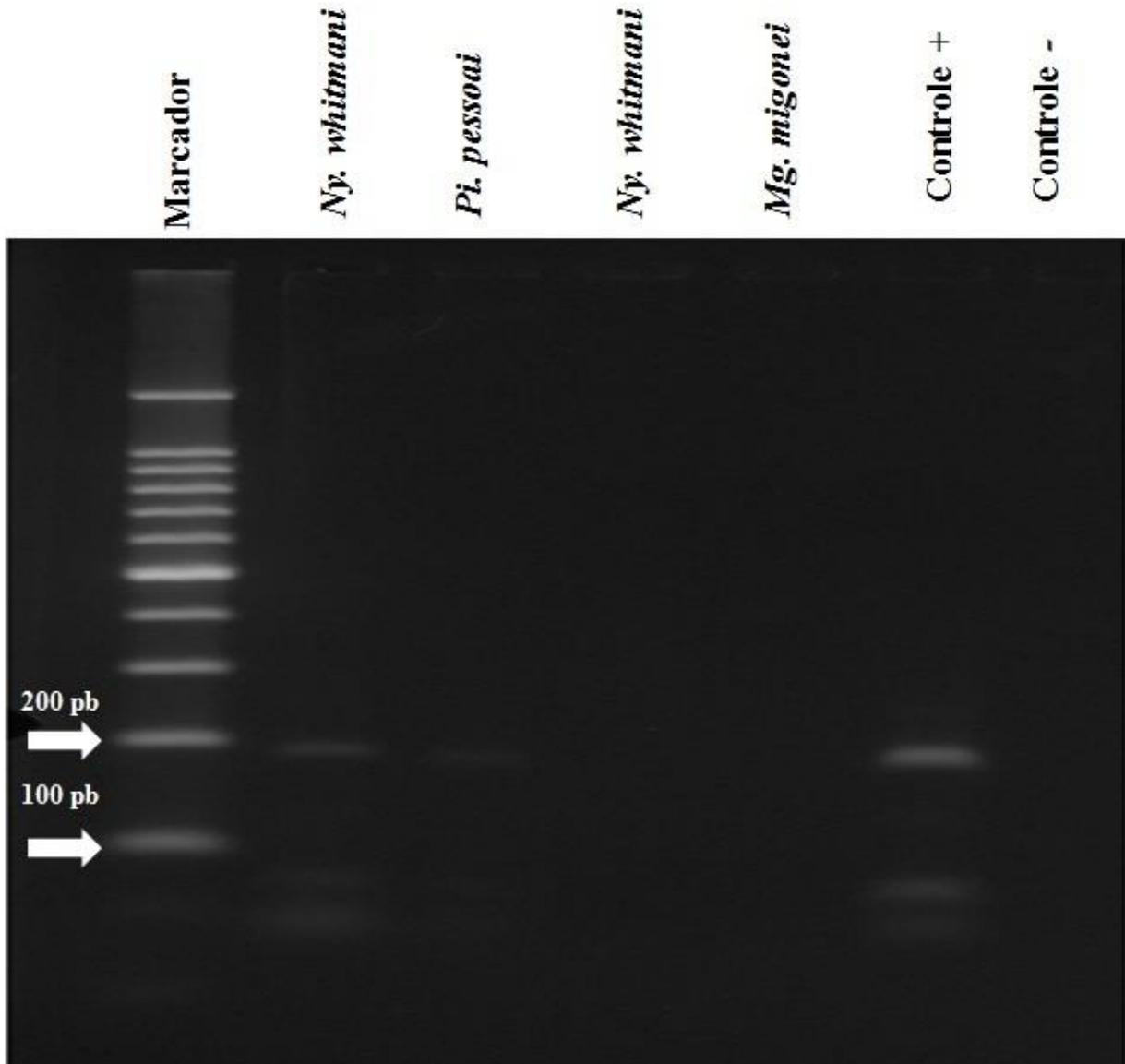


Figura 5. Digestão das regiões amplificadas ITS1 da espécie de *L. (L.) infantum* com enzima de restrição HAE III de diferentes espécies de flebotomíneos.

DISCUSSÃO

A fauna flebotomínea nos fragmentos de esteve representada por 18 espécies e com infecção natural de *Ny. whitmani* por *L. (L.) infantum*, foi a espécie mais abundante e frequente; esteve presente em oito das 10 das matas estudadas, confirmando sua ocorrência frequente em matas residuais alteradas de ambientes urbanos como observado por Teodoro et al. (1998) e Oliveira et al. (2000). Espécie que se adapta a habitats menos especializados ou mais diversificados, com grande capacidade de se adaptar ao ambiente antrópico (Aguiar & Medeiros 2003, Teodoro et al 1998).

Saraiva et al. (2010), também encontraram *Ny. whitmani* naturalmente infectada por *L. (L.) infantum*, em Belo Horizonte, MG. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, em residências próximas à fragmentos de mata, encontramos *Ny. whitmani*, *Pa. bigeniculata* e *Lu. longipalpis* naturalmente infectadas por *L. (L.) infantum*.

As espécies *Mi. acanthopharynx* e *Pi. misionensis* ocorrem pela primeira vez no município de Dourados. E a presença de *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. pessoai*, espécies envolvidas na transmissão de *Leishmania* no Brasil, presentes em ambiente de mata próximo às residências deve servir como alerta para os órgãos competentes em saúde pública pela possibilidade de surto de leishmaniose visceral e tegumentar, uma vez que a doença em humanos teve o seu primeiro caso autóctone no município em 2012.

REFERÊNCIAS

Aguiar, GM & Medeiros, WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. *In: Flebotomíneos do Brasil*, Rangel EF & Lainson R. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003:207-255.

Azevedo, ACR, Luz SLB, Vilela, ML, RANGEL, EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 1993, 88(4):509-512.

Barata, RA, França-Silva, JC, Fortes-Dias, C.L, Costa, RT, Silva, JC, Vieira, EP, Prata, A, Michalsky, EM, Dias, ES. Phlebotomines sand flies in Porteirinha, na endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 2004, 99:481-487.

Barbosa, GM, Marzochi, MCA, Massard, CL, Lima, GPS, Confort, EM. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 1999, 15:641-646.

Cipa Group. A programme for computer aided identification of phlebotomine sandflies of the America (Cipa) – presentation and check-list of American species. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 1993, 88(2):221-230.

Dedet, JP. *Leishmania* et leishmanioses du contiente américain. *Annales de L' Institute Pasteur*, 1993, 4:3-25.

El Tai , NO, Osman, OF, El Fari, M, Presber ,W, Schönian, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 94:575-579.

Forattini, OP. *Entomologia médica*. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp, 1973, v.4, 658p.

Forattini, OP, Rabello, EX, Serra, OP, Cotrim, MD, Galati, EAB, Barata, JMS. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 1976, 10:31-43.

Galati, EAB. Classificação de Phlebotominae. Apostila da disciplina HEP 5752 do Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública. São Paulo, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo/USP.

Galati, EAB. Morfologia e taxonomia. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (orgs.). Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003:23-51. 367p.

Galati, EAB, Nunes, VLB, Cristaldo, G, Rocha, HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 2003a, 32(2):235-261.

Galati, EAB, Nunes, VLB, Boggiani, PC, Dorval, MEMC, Cristaldo, G, Rocha, HC, Oshiro, ET, Gonçalves-de-Andrade, RM, Naufel, G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2003b, 47(2):283-296.

Galati, EAB, Nunes, VLB, Boggiani, PC, Dorval, MEMC; Cristaldo, G, Rocha, HC, Oshiro, ET, Damasceno-Junior, GA. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 2006, 101(2):175-193.

Gomes, AC, Barata, JMS, Rocha, E, Silva, EO, Galati, E.B. Aspectos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínea antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil (1). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1989, 31(1):32-39.

Killick-Kendrick, R.. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 1990, 4:1-24.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>>. 2014.

Lima, AP, Minelli, L, Teodoro, U, Comunello, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado o Paraná, Brasil. *Anais Brasileiros Dermatologia*, 2002, 77(7):681-692.

Loxdale, HD, Lushai, G. Molecular markers in entomology (Review). *Bulletin of Entomological Research*, 1998, 88(6):577-600.

Marcondes, CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomological News*, 2007, 118(4):351-356.

Missawa, NA, Lorosa, ES, Dias, ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2008, 41(4):365-368.

Oliveira, AG, Falcão, AL, Brazil, RP. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 2000, 34(6):654-655.

Oliveira, GA, Galati, EAB, Oliveira, O, Oliveira, GR, Espíndola, IAC, Dorval, MEMC, Brazil, RP. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 2006, 101(8):869-874.

Santos, SO, Arias, J, Ribeiro, AA, Hoffman, MP, Freitas, RA, Malacco, MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 1998, 12(3):315-317.

Saraiva, L, Andrade Filho, JD, Silva, SO, Andrade, ASR, Melo, MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105(8):1033-1039.

Schönian G, Nasereddin, A, Dinse, A, Schweynoch, CH, Schalling, HDFH, Presber, W, Jaffe, CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 47:349-358.

Sherlock, IA. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (org.) Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003:15-22.

Teodoro, U, Kuhl, JB, Santos, DR, Rodríguez, M, Santos, ES, Maróstica, LM. Flebotomíneos coletados em florestas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1998, 31: 517-22.

Tolezano, JE, Taniguchi, HH, Elias, CR & Larosa, R. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 2001, 60(1):47-51.

Vexenat, JA Barreto, AC, Cuba, CC, Marsden, PD. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínea. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1986, 81(3):293-301.

CAPÍTULO 3

Manuscrito 2. Primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral:
sequenciamento molecular

Periódico: The Journal of Infectious Diseases (a submeter).

**PRIMEIRO CASO AUTÓCTONE DE LEISHMANIOSE VISCERAL:
SEQUENCIAMENTO MOLECULAR**

Magda Freitas Fernandes¹, Thiago Leite Fraga², Ana Paula Silva Levay³, Kleiton Maciel dos Santos¹, Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval⁴, Daniel Salas Steinbaum³, Wedson Desidério Fernandes⁵, Wanderlei Onofre Schmitz³, Alessandra Gutierrez de Oliveira⁴, Fábio Juliano Negrão⁶, Eunice Aparecida Bianchi Galati⁷.

¹Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD); ²Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; ³Hospital Universitário, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD); ⁴Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS); ⁵Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD); ⁶Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD); ⁷Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP).

Autor Correspondente: Magda Freitas Fernandes. Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum Km12, CEP79804-070, Dourados-MS, Tel.: (67) 3410-2198.

Email: magdamattosfer@gmail.com

RESUMO

No Brasil, a *Leishmania (Leishmania) infantum* é a espécie comumente descrita como agente etiológico da leishmaniose visceral. Apresenta ampla distribuição geográfica e um sério problema de saúde pública, com registro de notificações em todas as regiões do país. No Mato Grosso do Sul, foram confirmados 2.856 casos humanos de 1999 a 2012, distribuídos em 56 municípios, com 240 óbitos. No município de Dourados foram confirmados dois casos autóctones em 2012, um em 2013, que veio a óbito e um caso em 2014. Pacientes admitidos no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, foram submetidos ao diagnóstico sorológico por teste rápido e foi utilizada amostra de aspirado de medula para a análise molecular e confirmação de *Leishmania (Leishmania) infantum* como agente etiológico. Portanto relata-se a primeira ocorrência do primeiro caso autóctone humano de leishmaniose visceral no município de Dourados, Mato Grosso do Sul.

Palavras-chaves: Leishmanioses, Agente etiológico, *Leishmania infantum*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa, não contagiosa, com distribuição, tanto no Velho Mundo como nas Américas (WHO, 2014). No Brasil, o primeiro registro dessa parasitose data de 1911 quando um imigrante italiano que residia em Porto Esperança, município de Corumbá, região oeste do estado de Mato Grosso do Sul teve o diagnóstico confirmado parasitologicamente (DEANE, 1956; MIGONE, 1913).

Em Mato Grosso do Sul (MS), tem-se verificado um incremento no número de casos de leishmaniose visceral, com ampliação de sua área de ocorrência. Até 1995, a doença estava restrita ao município de Corumbá e Ladário, no entanto, se expandiu para as localidades adjacentes, apresentando-se, atualmente, em 56 dos 79 municípios do Estado. De 1999 a 2012, 330 casos autóctones em 29 municípios, com 69,7% no município de Campo Grande; 7,3% em Rio Verde; 3% em Aquidauna; 2,4% em Coxim e Anastácio e 2,1% nos municípios de Três Lagoas e Jardim (SINAN, 2014a).

Em Dourados, MS de 2012 a março de 2014, foram notificados 17 casos. Destes quatro são casos autóctones com um óbito em 2013 (SINAN, 2014b). Desde 1998 vem

ocorrendo no município o aumento dos casos de leishmaniose visceral canina com monitoramento da fauna flebotomínea, no entanto, o aparecimento de casos humanos de leishmaniose visceral somente foi detectado a partir de 2012.

O conhecimento das espécies de *Leishmania* que circulam em determinado foco de transmissão, particularmente em regiões onde as diferentes formas clínicas circulam simultaneamente, é importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses, destacando-se, a identificação do agente causal por métodos específicos e não por correlação sintomatológica à espécie usualmente conhecida.

MÉTODOS

Pacientes admitidos no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), foram submetidos ao diagnóstico sorológico por meio de teste rápido, teste imunocromatográfico com o antígeno recombinante rK39 (complexo *Leishmania donovani*). Para confirmação do diagnóstico, o aspirado de medula foi submetido ao exame parasitológico direto e à reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR-), tendo como alvo uma região do espaçador transcrito interno do gene ribossomal (ITS 1) de aproximadamente 350 pb de *Leishmania* seguido de identificação do agente etiológico pela técnica de Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com a enzima de restrição Hae III (EL TAI *et al.*, 2000; SCHÖNIAN *et al.*, 2003).

O projeto foi submetido à Plataforma Brasil, com aprovação Favorável do Comitê de Ética em Pesquisa de Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), conforme normas da Resolução N° 196, de 10 de outubro de 1996, CAAE: 11422513.9.0000.5160, Parecer N° 329.200.

RESULTADO

Foi identificado em 2012, o primeiro caso autóctone humano de leishmaniose visceral, confirmando o agente causal *Leishmania (Leishmania) infantum* por métodos moleculares (Figura 1).

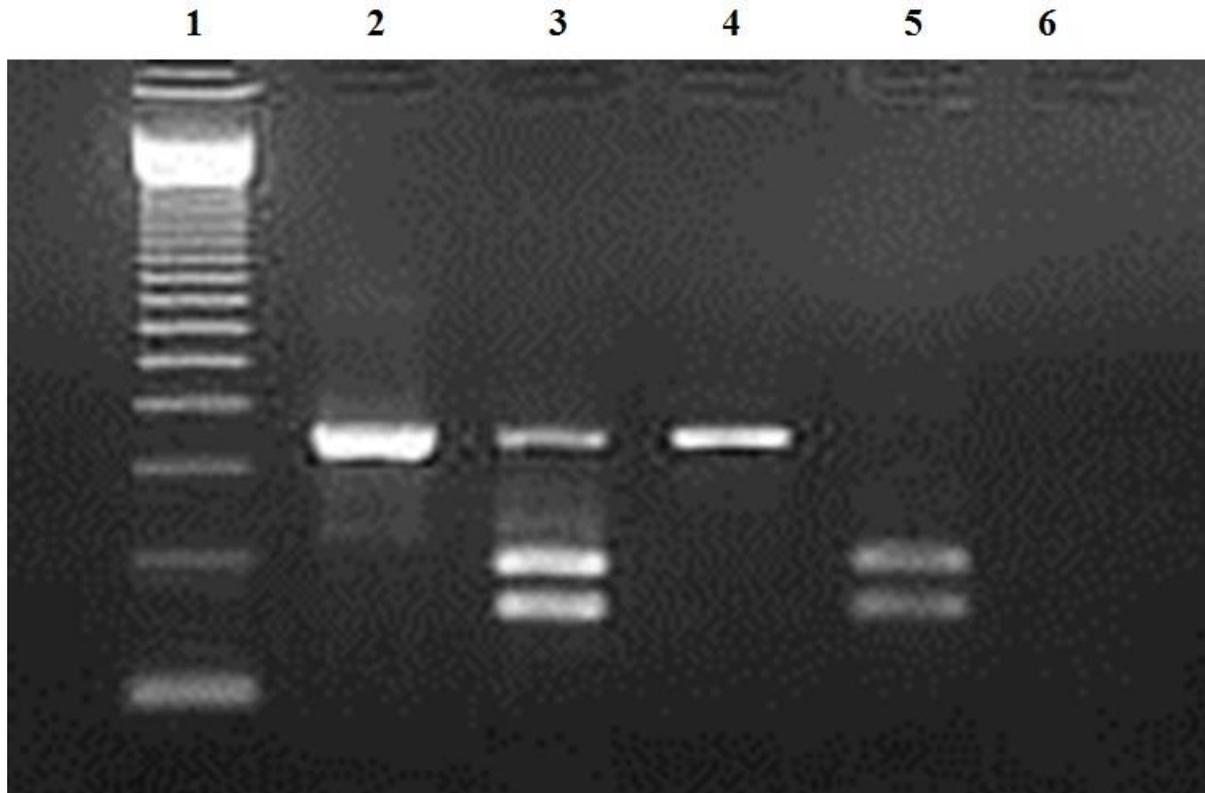


Figura 1. Produtos amplificados pela técnica de PCR seguida de polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição ITS 1 (RFLP) com a enzima Hae III. **Coluna 1.** Marcador molecular de 100 pb; **2.** Agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum* caso 1; **3.** Padrão de restrição caso 1; **4.** Agente etiológico *Leishmania (Leishmania) infantum* caso 2; **5.** Padrão de restrição do caso 2; **6.** Controle negativo.

DISCUSSÃO

Embora a leishmaniose visceral esteja em processo de expansão no estado de Mato Grosso do Sul (MS), ainda são escassos os estudos sobre a etiologia específica dessa parasitose em suas áreas de ocorrência. Desta forma a suspeita do primeiro caso humano de leishmaniose visceral em área ainda indene da doença, possibilitou a identificação molecular e contribuiu para a o diagnóstico individual das leishmanioses, possibilitando adequada conduta clínica e terapêutica dos pacientes e possibilitará novos estudos na relação entre os parasitas das diversas regiões do MS, bem como sua relação com o hospedeiro e com o vetor.

A pesquisa resultou no relato do primeiro caso autóctone humano de leishmaniose visceral com identificação do agente causal, a *Leishmania (Leishmania) infantum* pela técnica de amplificação de fragmento do minicírculo de kDNA, utilizando a enzima de restrição Hae III.

AGRADECIMENTOS

Aos profissionais do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela dedicação e empenho na concretização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. DEANE LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.
2. MIGONE LE. Um caso de Kalazar a Assuncion (Paraguay). Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique, Paris, 6:118-120, 1913.
3. SINAN (Estado). Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, 2014a.
4. SINAN (Município). Coordenadora Municipal de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde de Dourados-MS, 2014b.
5. EL TAI NO, OSMAN OF, EL FARI M, PRESBER W, SCHÖNIAN G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 94:575-579, 2000.
6. SCHÖNIAN G, NASEREDDIN A, DINSE A, SCHWEYNOCH, SCHALLING HDFH, PRESBER W, JAFFE CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 47:349-358, 2003.
7. WHO. (<http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>), 2014.

CAPÍTULO 4

Manuscrito 3. Remoção e transferência de ovos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) para estabelecimento de sua progênie em laboratório

Periódico: Revista Brasileira de Entomologia (a submeter).

**REMOÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE OVOS DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) PARA ESTABELECIMENTO
DE SUA PROGÊNIE EM LABORATÓRIO**

Magda Freitas Fernandes¹, Kleiton Maciel dos Santos¹, Fredy Galvis Ovallos², Antonio Carlos Ferrari Júnior¹, Fábio Juliano Negrão¹, Wedson Desidério Fernandes¹, Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval¹, Alessandra Gutierrez de Oliveira³, Eunice Aparecida Bianchi Galati².

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFGD), Rodovia Dourados-Itahum Km12 – Cidade Universitária, CEP 79804-070, Dourados-MS. ²Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), CEP 01246-904, São Paulo, SP. ³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária s/n, 79070-900 Campo Grande, MS.

Autor Correspondente: Magda Freitas Fernandes. Email.: magdamattosfer@gmail.com

RESUMO

Estudos sobre a competência vetorial de uma espécie de flebotomíneo em relação à *Leishmania* spp. apresentam como um dos grandes desafios a obtenção de fêmeas de primeira geração em número suficiente para desenvolver os experimentos. Estes envolvem fêmeas alimentadas em animal infectado pelo parasita, e decorrido o período de incubação extrínseca, desafiá-las a se alimentarem em animais suscetíveis. O objetivo do trabalho foi relatar técnica eficiente para a remoção e transferência de ovos de flebotomíneos para obtenção de sua progênie em laboratório para estudos de sua competência vetorial em relação à *Leishmania* spp. Fêmeas selvagens de flebotomíneos foram individualizadas para a postura dos ovos que ocorreu na parede do frasco ou em substrato representado por uma camada de gesso úmido forrando o fundo do frasco. Como os ovos durante a postura são envoltos por uma camada de substância levemente aderente; para a remoção deles foi realizada sob um estereomicroscópio um leve toque com a ponta de um pincel com poucas cerdas para desgrudá-los do substrato. A seguir, o frasco foi virado com a boca para baixo e um pouco acima do substrato (camada de gesso umedecido) que reveste o fundo de uma placa de Petri. Então com a base de uma pinça foram feitas leves batidas na superfície externa da base do frasco e os ovos caíram na placa de cultivo. Este procedimento adotado reduziu o tempo para a remoção e transferência dos ovos.

PALAVRAS-CHAVE: *Nyssomyia whitmani*, Oviposição, Colonização.

INTRODUÇÃO

As fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) põem seus ovos isoladamente ou em pequenos conjuntos sobre substrato onde permanecem levemente aderidos por substância formada de grânulos, produzida pelas glândulas acessórias que se abrem na câmara genital. Os ovos apresentam pouca resistência à dessecação e necessitam de umidade elevada para se desenvolverem. Quando postos em substratos com baixo teor de umidade, murcham rapidamente e não há eclosão de larvas, mesmo quando reconduzidos para ambientes úmidos onde readquirem a forma normal; a sensibilidade dos ovos à dessecação aumenta à medida que se aproxima o momento da eclosão (Forattini 1973).

Os ovos de flebotomíneos não apresentam mobilidade e são colocados diretamente no substrato que servirá para o desenvolvimento larval. São de coloração variada e tendem a adquirir tonalidade mais escura, em geral, dentro de 24 horas após a oviposição. As fêmeas grávidas podem realizar a postura praticamente em qualquer superfície úmida e a temperaturas que oscilem entre 20 e 30°C. O ar ambiente, próximo à saturação ou mesmo saturado de umidade, parece propiciar a deposição de maior número de ovos (Forattini 1973).

Waterston (1922) e Barreto (1942) verificaram que, mesmo após imersão em água durante certo tempo, apreciável proporção de ovos de flebotomíneos pode eclodir de maneira normal. Todavia, o excesso de umidade que chegue a formar película líquida sobre eles, tem sido considerado prejudicial. Em consequência, atribui-se-lhe retardamento no desenvolvimento embrionário, diretamente proporcional à duração do período de imersão. Decorridas 24 a 48 horas dentro d' água ou a três dias de cobertura pela película líquida, não ocorre mais a eclosão (Whittingham e Rook 1923, Barreto 1942). O contato com a água, pelo menos por tempo limitado, não afeta substancialmente os ovos, ensejou a vários pesquisadores o uso desse líquido para removê-los dos vários substratos e colocá-los nos meios de cultivo, de modo rotineiro, com o subsequente resultado do estabelecimento de colônias.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de progênie em laboratório de *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939), as fêmeas selvagens foram alimentadas em hamsters não infectados, linhagem *Mesocricetus auratus* e individualizadas para realizar a postura dos ovos.

Para a individualização das fêmeas ingurgitadas (que fizeram o repasto sanguíneo) foi utilizado tubos de polietileno (35,5 mm altura x 26,7 mm diâmetro), contendo uma camada de gesso pedra creme no fundo (umedecido), que funciona como substrato e para a manutenção da umidade do microambiente. O tubo foi tampado com tampa plástica contendo um furo em seu meio, vedado com uma tela de náilon presa à tampa. Sobre a tela colocou-se pedacinhos de maçã como fonte de carboidrato para as fêmeas. Após a postura as fêmeas foram identificadas e foi realizada a remoção e transferência dos ovos para as placas de cultivo para o desenvolvimento das formas imaturas até à emergência.

Esse método consistiu da utilização de um pincel com poucos fios apenas para deslocar o ovo do substrato. A seguir, o tubo foi invertido com a boca apontada para o interior de uma placa de cultivo (com o gesso já umedecido), e na superfície externa do fundo do

tubo, foram dadas pequenas batidas com a base de uma pinça para que os ovos caíssem. É importante limpar bem os fios do pincel quando fizer a transferência de ovos de um próximo tubo, se as fêmeas individualizadas ainda não foram identificadas. Todo o procedimento foi feito sob um estereomicroscópio (Figura 1).

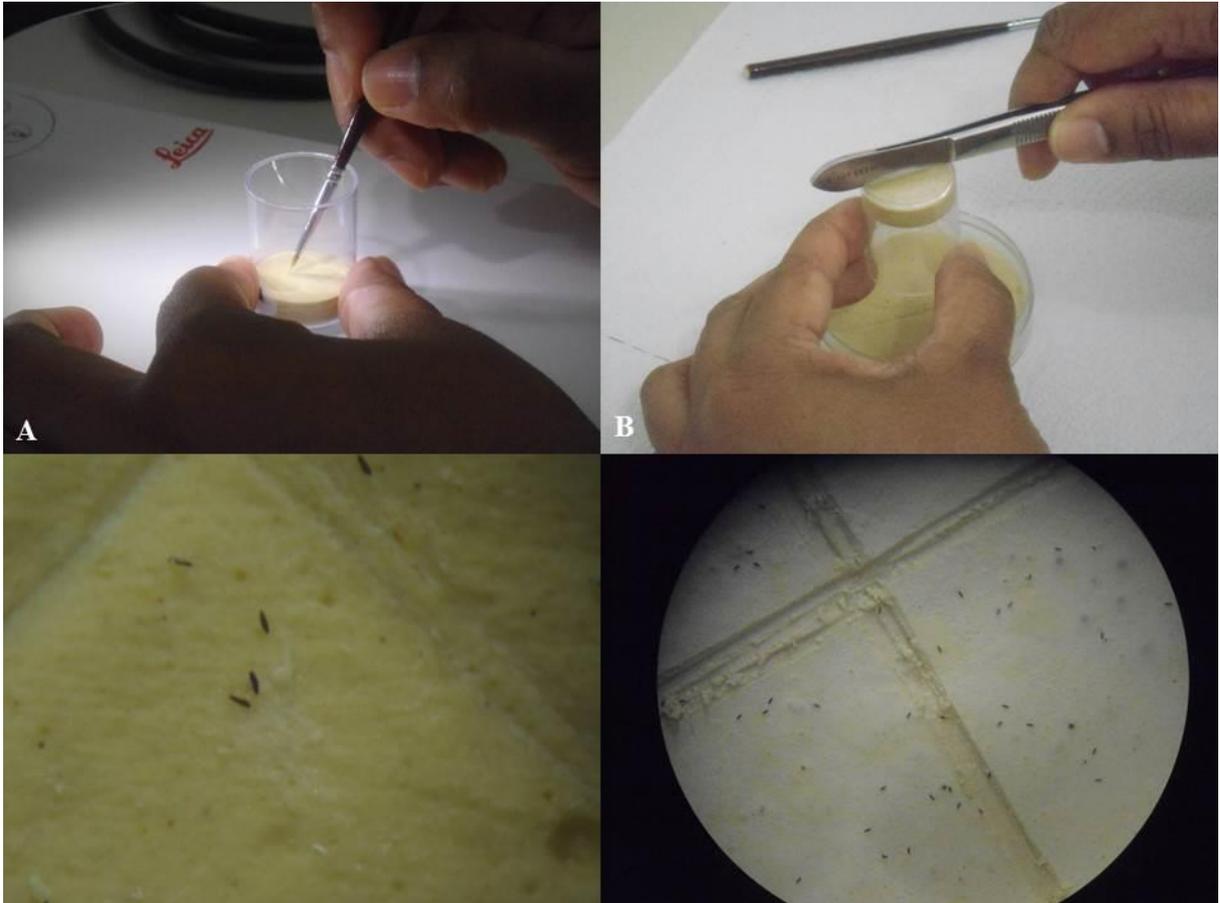


Figura 1. (A) Pincel para deslocar o ovo do substrato (gesso). (B) Tubo foi invertido e batendo-se com um pinça externamente, no fundo do tubo, os ovos caem sobre a camada de gesso. (C) Ovos sobre a camada de gesso umedecido na placa de cultivo. (D) Placa de cultivo com ovos de *Ny. whitmani*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a remoção dos ovos, inicialmente adotou-se por meio líquido (água). No entanto, a dificuldade era grande e gastava-se muito tempo para a transferência para as placas de cultivo. Dependendo do número de fêmeas individualizadas e da quantidade de ovos por tubo, demorava-se dois dias ou mais para finalizar a transferência dos ovos; além do excesso de umidade no meio de cultivo, prejudicando a eclosão das larvas e/ou provocando a morte de larvas do primeiro estágio (L1). O excesso de umidade também acelerava o crescimento

excessivo de hifas dos fungos quando era colocada a ração para alimentação, provocando alta mortalidade das larvas L1.

Considerando a necessidade de uma grande quantidade de ovos viáveis que pudesse gerar adultos em número suficiente para os experimentos de competência vetorial e da redução de tempo para a remoção dos ovos para o meio de cultivo, evitando danos para o desenvolvimento embrionário e eclosão das larvas, buscou-se um método alternativo para a remoção e transferência dos ovos.

Na técnica usual, por meio líquido, a remoção e transferência dos ovos demorava cerca de 10 minutos por tubo, aumentando à medida que o número de ovos fosse superior.

Na técnica atual, aproximadamente um minuto por tubo, independente da quantidade de ovos e não houve mortalidade de larvas L1 e também não houve o aumento excessivo de hifas dos fungos. O tempo de transferência reduziu muito, em relação à técnica de remoção dos ovos por meio líquido.

Portanto, apresentamos uma técnica eficiente para a remoção dos ovos de flebotomíneos do substrato de postura e transferência deles para o meio de cultivo para estabelecimento de sua progênie em laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Forattini, O. P. Entomologia médica. 1973. São Paulo: Edgard Blücher / Edusp, v. 4, 658p.
2. Waterston, J. 1922. A contribution to the knowledge of bionomics of sandflies. Ann. Trop. Med. Parasit., 16:69-92.
3. Barreto, M. P. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). 1942. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP. Tese.
4. Whittingham, H. E. & Rook, A. F. 1923. Observations on the life-history and bionomics of *Phlebotomus papatasi*. Brit. Med. J. 2(3285):144-1151.