

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

MAURÍCIO LUIZ VILELA

INFLUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-FLEBÓTOMOS EM FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador (es):** Prof. Dr<sup>a</sup>. Yara Maria Traub-Csekö  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Ferreira Rangel

**RIO DE JANEIRO**

1999

Ficha Catalográfica

V699

Vilela, Maurício Luiz

Influência de anticorpos anti-flebótomos em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em condições experimentais.

Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

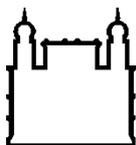
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 1999.

134 p.

1. Anticorpos- anti-flebótomos 2. *L. longipalpis* 3. Biologia 4. Phlebotominae

CDD. 595.771



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

MAURÍCIO LUIZ VILELA

Influência de anticorpos anti-flebótomos em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em condições experimentais.

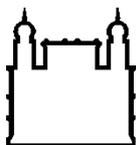
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr<sup>a</sup>. Yara Maria Traub-Csekö  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Ferreira Rangel

Aprovada em: 28/12/1999

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mauro Celio Almeida Marzochi (Presidente)  
Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Elvira Saraiva Bou-Habib

Rio de Janeiro, 28 de dezembro de 1999.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

INFLUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-FLEBÓTOMOS EM FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Dissertação de Mestrado

Maurício Luiz Vilela

Ao meu filho Livio  
À minha esposa Mayumi  
À minha mãe Dalva  
À Yasmin  
Com todo meu amor.

Aos meus saudosos avós Lauro e Emília, fundamentais em minha vida.

“Tudo no mundo começou com um sim. Uma molécula disse sim a outra molécula e nasceu a vida. Mas antes da pré-história havia a pré-história da pré-história e havia o nunca e havia o sim. Sempre houve. Pensar é um ato. Sentir é um fato”

(Clarice Lispector)

“Tudo é a metade e o contrário da outra parte, diferente para fazer a unidade do que é contrário”

(Herbert de Souza)

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram e contribuíram para tornar possível à realização desse trabalho, e, em particular:

À Dr<sup>a</sup> Yara Maria Traub-Csekö, Pesquisadora do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, pela orientação, leitura crítica dos manuscritos e a oportunidade em vislumbrar novos conhecimentos, o meu respeito.

À Dr<sup>a</sup> Elizabeth Ferreira Rangel, Chefe do Departamento de Entomologia e do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz, pela orientação, determinação e senso crítico em todas as etapas do trabalho e também pela convivência estimulante durante todos esses anos.

À Dr<sup>a</sup> Denise Valle, Pesquisadora do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz pela revisão crítica dos manuscritos e sugestões valiosas, os meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, Chefe do Laboratório de Leishmanioses, do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, por seu espírito cooperativo e solidário nas viagens realizadas à Gruta da Lapinha, Minas Gerais, minha admiração e respeito.

À Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Pereira de Oliveira, do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose e Oncocercose, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo seu apoio fundamental, tornando possível a retomada de nossas atividades.

Ao Dr. Pedro Hernan Cabello Acero, Vice-Diretor do Instituto Oswaldo Cruz por sua valiosa contribuição na análise estatística dos dados e por sempre nos receber com muita cordialidade e respeito.

Ao Dr. Elói de Souza Garcia, Presidente da Fundação Oswaldo Cruz; Dr. José Rodrigues Coura, Diretor do Instituto Oswaldo Cruz; Dr. Renato S. Balão Cordeiro, Vice-Presidente de Ensino e Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz e ao Dr. Samuel Goldenberg, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e

Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio dado no transcorrer da realização do trabalho.

As amigas Nataly Araujo de Souza e Claudia Alves de Andrade-Coêlho, do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose e Oncocercose, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, por nos acompanhar durante toda a trajetória e também pelos momentos alegres e estimulantes ao longo desses anos.

À doutoranda Diamar Costa Pinto, do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, por sua inestimável contribuição na execução de algumas etapas do trabalho.

Ao Dr. Gustavo Marins de Aguiar, do Laboratório de Diptera do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, com quem iniciamos os estudos sobre os flebotomíneos.

Ao Dr. Ítalo Sherlock, Pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, pelo empenho para que pudéssemos realizar as excursões em Jacobina, e pela atenção e estímulo.

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, que disponibilizou toda a infraestrutura para a realização de nossas viagens à Jacobina, e também aos funcionários daquele centro que colaboraram neste sentido.

Aos colegas Alfredo, Luiz Henrique, André, Simone, Wagner, Lurdes, Claudia, Claudio, Lisbete, Paulo, Marcelo, Alann do Laboratório de Transmissores de Leishmaniose e Oncocercose, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo estímulo constante e espírito profissional ao longo de todos esses anos.

Aos integrantes do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz pelo carinho, respeito e convivência alegre, sempre presente nas inúmeras vezes em que me ajudaram.

Aos companheiros de luta do Departamento de Entomologia, Nildimar Alves Honório, Teresa Cristina Monte Gonçalves, Carmen Flores Mendoza, Adenildo Vasconcellos, Arlindo Serpa Filho pelo convívio, incentivo e momentos inesquecíveis em que passamos juntos, durante os últimos meses, objetivando a finalização de nossas dissertações.

Aos integrantes da Coleção de Tripanossomatídeos, do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Departamento de Entomologia, do Instituto Oswaldo Cruz, em especial a Técnica de Pesquisa Sheila Medeiros dos Santos Pereira e a Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora de Souza que disponibilizaram equipamentos para a realização de algumas atividades.

Às secretárias do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz Angela Lúcia Carvalho e Simone Tavares Marujo, sempre atenciosas e colaboradoras nas horas necessárias.

Aos colegas do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio, respeito e cooperação profissional.

Às secretárias Cleide e Eliete do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo carinho e compreensão durante todos esses anos.

Ao Doutorando José Marcelo Ramalho-Ortigão, do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, por nos auxiliar em algumas etapas do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz por sempre nos receber com muito respeito e estímulo em todos os momentos do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Leishmanioses, do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, que em diversas oportunidades nos acolheu com muito carinho, em especial a Prof. Alda Lima Falcão pelo seu espírito alegre e cordial sempre presente.

Ao Técnico de Pesquisas, Antônio Carlos dos Santos, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, que muito nos auxiliou nas viagens à Jacobina.

Ao Tecnologista Carlos Alberto Muller, do Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, por sua colaboração para manter e acondicionar os coelhos utilizados no estudo.

À Dr<sup>a</sup> Marli Maria Lima, do Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz, por possibilitar a utilização das dependências do referido departamento para execução de algumas etapas do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica Imunologia Fisiologia de Insetos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Denise Feder que nos permitiu o uso do leitor de ELISA.

Aos funcionários da Biblioteca Central da FIOCRUZ pela gentileza e atenção durante todos esses anos.

Aos integrantes do Laboratório de Produção e Tratamento de Imagens do Instituto Oswaldo Cruz, pela confecção das figuras e slides utilizados no trabalho, em especial à Rodrigo Mexas.

Ao Setor de Transportes da Fundação Oswaldo Cruz, pela atenção dispensada nas solicitações de veículos, quando realizamos as excursões ao campo.

Ao motorista da FIOCRUZ Paulo Roberto de A. Góes, que nos acompanhou nas diversas viagens que realizamos para coletar material.

Aos colegas da Disciplina de Protozoologia, coordenada pelo Dr. Sílvio Celso Costa, no ano de 1996, pelo convívio alegre e estimulante durante o curso.

Ao Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo suporte financeiro ao projeto.

À minha família, em especial as tias Lourdes e Rosinha que participaram de forma importante na minha formação.

Ao amigo Sérgio da Cruz Araújo por nossa cumplicidade diante da vida.

## ÍNDICE

	Página
1- Resumo.....	1
2- Summary.....	2
3- Introdução.....	3
1. As Leishmanioses.....	3
2. Medidas de controle.....	19
2.1-Relevância.....	19
2.2-Preceitos de Controle.....	19
2.3- Inseticidas.....	20
2.4- Medidas Alternativas de Controle.....	21
4- Objetivos.....	33
1- Geral.....	33
2- Específicos.....	33
5- Material e Métodos.....	34
1- Procedência dos Espécimens de <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizados nos experimentos.....	34
1.1. Justificativa.....	34
2- Obtenção e Manutenção, em insetário, dos exemplares de <i>L.</i> <i>longipalpis</i> .....	35
2.1. Espécimes Provenientes de Jacobina.....	36
2.2. Espécimes Provenientes da Gruta da Lapinha.....	39
3- Obtenção dos antígenos.....	40
4- Obtenção do soro pré-imune.....	43
5-Imunização dos coelhos.....	43
6-Alimentação das fêmeas de <i>L. longipalpis</i> em coelhos imunizados.....	45
7- Western Blot.....	46
7.1. Eletroforese.....	46
7.2. Transferência do gel.....	46
7.3. Reação com anticorpos.....	47
8- ELISA.....	47
8.1. Quantificação de proteínas dos extratos de flebótomos.....	47
8.2. Teste de ELISA.....	48

9. Análise Estatística.....	48
6- Resultados.....	51
1. Análise dos soros.....	51
2. Avaliações dos parâmetros biológicos de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> .....	54
2.1. Aceitação do repasto sanguíneo.....	54
2.2. Postura.....	54
2.3. Mortalidade.....	58
2.3.1. Fêmeas mortas sem postura (MSP).....	59
2.3.2. Fêmeas mortas com postura (MCP).....	61
2.4. Longevidade.....	64
2.4.1. Fêmeas mortas sem postura (MSP).....	66
2.4.2. Fêmeas mortas com postura (MCP).....	68
7- Discussão.....	71
8- Conclusões.....	83
9- Referências Bibliográficas.....	84
10- Anexo.....	98
11- Abreviaturas.....	109

## RESUMO

As medidas empregadas para o controle das leishmanioses têm se mostrado insuficientes para conter o avanço do número de casos. Uma estratégia alternativa de controle, a ser investigada, é a imunização de hospedeiros vertebrados com extratos derivados de fêmeas do vetor e componentes da saliva. No presente estudo, foi avaliado o efeito de anticorpos anti-flebótomos sobre alguns parâmetros de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de leishmaniose visceral, alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos (tubo digestivo de fêmeas alimentadas com sangue – TDS, tubo digestivo, açúcar/TDA, corpo total, sangue/CTS e corpo total, açúcar/CTA e em coelho exposto a sucessivas picadas/PICADA). A avaliação por ELISA revelou que os soros imunes possuíam títulos aumentados em relação aos respectivos pré-imunes. Polipeptídeos específicos reconhecidos por todos os soros foram detectados por Western blot. Os parâmetros biológicos analisados foram: aceitação do repasto, postura de ovos e mortalidade. Com relação à aceitação do repasto, não foram observadas diferenças. Os outros dois parâmetros analisados apresentaram variações sutis, que foram evidenciadas após aplicação de diferentes testes estatísticos. O número de ovos postos apresentou diferenças estatisticamente significativas; em especial, o grupo TDS foi aquele que registrou o menor número de ovos quando analisado pela Mediana. A mortalidade (e a longevidade) foi analisada separando-se as fêmeas mortas sem postura e com postura (MSP e MCP, respectivamente). De maneira geral, os grupos PICADA e CTS foram os mais afetados. Em quase todos os grupos, a análise das fêmeas MCP revelou pico de mortalidade no 5º dia. Os resultados sugerem que anticorpos anti-flebótomos podem alterar aspectos biológicos de fêmeas de *L. longipalpis* e este mecanismo deve ser investigado, no futuro, como um método alternativo de controle da transmissão das leishmanioses.

## ABSTRACT

It has been shown that presently control measures are not able to face increasing number of leishmaniasis cases. An alternative control strategy, yet to be investigated relates to the immunization of vertebrate hosts with extracts derived from sand flies or with their saliva components. In the present study, rabbits were immunized with different extracts from *Lutzomyia longipalpis*, a visceral leishmaniasis vector, and used to feed additional *L. longipalpis*. The extracts utilized for immunization were: gut from blood fed (TDS) or sugar fed (TDA) females and total body, deprived from gut, from these same flies (CTS and CTA, respectively). An additional rabbit, previously submitted to several *L. longipalpis* bites (PICADA) was also used as blood feeding source. Sera evaluation was realized through ELISA and Western blotting revealing, respectively, higher titres and recognition of specific polypeptides in all the tested immune sera. Feeding acceptance, egg laying and mortality were the biological parameters through which the engorged females were analysed. No differences were observed concerning feeding acceptance. The other parameters presented subtle variations that were put on evidence after different statistical tests. The number of eggs laid was different when all groups were compared, the TDS group presenting the smallest values when Median was considering. Mortality (and longevity) was analysed in two different groups: females dead with (MCP) or without (MSP) egg laying. PICADA and CTS were the more affected groups in the all the cases. A peak of mortality in the fifth day after feeding was observed in almost all the MCP groups. These results suggest that anti-sandfly antibodies can modify some biological aspects of *L. longipalpis* and this mechanism could be more investigated, as an alternative control method for leishmaniasis transmission.

## INTRODUÇÃO

### 1- AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são moléstias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), apresentando diferentes manifestações clínicas nas populações humanas. A forma benigna, que produz lesões limitadas, ulcerosas ou não, é chamada de leishmaniose cutânea. Porém, quando ocorrem lesões que comprometam as mucosas do nariz, boca e faringe, a forma é denominada de leishmaniose cutâneo-mucosa. Havendo ainda, indivíduos que apresentam formas disseminadas, essa é designada de leishmaniose difusa. Por outro lado, a forma clínica que compromete o fígado, baço, medula óssea, e, tecidos linfóides é conhecida como leishmaniose visceral (Rey, 1991). Atualmente são conhecidas pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania* nas Américas, das quais 14 são responsáveis pela ocorrência da doença (Lainson & Shaw, 1998). No Velho Mundo 11 espécies estão implicadas em causar as leishmanioses ao homem (Killick-Kendrick, 1990).

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, afetando, indistintamente, homens, mulheres e crianças. Sua distribuição atinge as regiões tropical e subtropical da América, África, Ásia e países margeados pelo Mediterrâneo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é constatada a ocorrência da doença em 88 países, dos quais 16 são países desenvolvidos. A incidência anual da doença, em nível mundial, registra números na ordem de dois milhões de casos, com aproximadamente quinhentos mil para leishmaniose visceral, e de um a um milhão e quinhentos mil para leishmaniose cutânea, embora somente seiscentos mil casos sejam oficialmente notificados pela rede pública. Trezentos e cinquenta milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão. Países como Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão concentram aproximadamente 90% dos

casos de leishmaniose visceral que ocorrem no mundo. Os dados de leishmaniose mucocutânea demonstram que 90% dos casos estão inseridos em países latino-americanos como Bolívia, Brasil e Peru. No que se refere à leishmaniose cutânea, a maior incidência atinge principalmente o Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, onde ocorrem cerca de 90% de casos do total mundial (OMS, Divisão de Controle de Doenças Tropicais, 1998).

Os reservatórios primários e secundários das espécies de *Leishmania* são mamíferos silvestres ou domésticos e pertencem às ordens Carnivora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla. Esses animais participam do ciclo silvestre, e, em algumas situações, são sugeridos como responsáveis pela manutenção do ciclo peridoméstico e urbano, servindo de fonte de infecção para os flebotomíneos vetores.

Os vetores das leishmanioses são insetos dípteros nematóceros, chamados de flebótomos, pertencentes à subfamília Phlebotominae e popularmente conhecidos no Brasil como: asa branca, cangalhinha, birigui, anjinho, tatuquira, dentre outros.

No Novo Mundo, três gêneros de flebótomos são reconhecidos: *Lutzomyia* França & Parrot, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1940 (Young & Duncan, 1994); entretanto, é no gênero *Lutzomyia* que são encontradas as espécies responsáveis pela transmissão da doença ao homem. Já no Velho Mundo existem três gêneros: *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987, destacando-se importância para o gênero *Phlebotomus*.

Nas Américas, cerca de 800 diferentes espécies de flebotomíneos foram descritas, porém, pouco mais de 20 delas são prováveis ou suspeitas de transmitirem as leishmanioses humanas. Esses dípteros são, também, responsáveis

pela transmissão de uma moléstia que acomete as populações dos Andes Peruanos, a bartonelose ou “verruca peruana”, e estão igualmente implicados na transmissão de algumas arboviroses humanas e de outros vertebrados.

Os parasitas das leishmanioses têm basicamente duas distintas formas em seu ciclo de vida. Uma forma infectante, que apresenta motilidade, através de um flagelo, e vive no tubo digestivo da fêmea do flebótomo vetor, é denominada promastigota. A outra é encontrada em macrófagos dos hospedeiros vertebrados, e recebe o nome de amastigota (Walters et al.1989).

A infecção dos flebátomos se dá quando as fêmeas desses dípteros realizam a alimentação sanguínea em hospedeiros silvestres ou domésticos, momento em que são ingeridas formas amastigotas livres ou interiorizadas em macrófagos dos hospedeiros. O alimento sanguíneo vai para o intestino médio, onde é envolvido por uma estrutura composta de quitina e glicoproteínas, secretada pelo epitélio intestinal, a matriz peritrófica. Durante as primeiras 24 horas da realização do repasto sanguíneo, já em processo de diferenciação celular transformam-se em promastigotas (Adler, 1964; Walters et al. 1993). Neste período ocorre uma rápida multiplicação dentro do espaço intraperitrófico, e essas promastigotas, designadas de procíclicas, aderem às células do epitélio intestinal através de uma molécula de superfície, o lipofosfoglicano (LPG) (Pimenta et al. 1992, 1994). Essa adesão constitui-se num pré-requisito fundamental para o desenvolvimento do parasito no tubo digestivo do inseto vetor (Dillon & Lane, 1999). Decorridas aproximadamente 72 horas do repasto infectante, a matriz peritrófica é degradada e permite que os promastigotas migrem para a porção posterior (parasitas da Seção Peripilária), ou para as porções anterior e média (parasitas da Seção Suprapilária) do intestino, onde novamente ocorrem processos de multiplicação e diferenciação celular. Em torno do quinto dia pós-repasto, os parasitas migram para porção anterior,

preferencialmente para a válvula esofagiana. A transmissão para outro hospedeiro vertebrado ocorre quando fêmeas infectadas realizam nova alimentação sanguínea, regurgitando formas promastigotas infectivas, chamadas de metacíclicas (Walters, 1993; Walters et al. 1989; Walters et al. 1992; Walters et al. 1987; Grimaldi & Tesh, 1993).

As diversas manifestações clínicas da doença sugerem a participação de uma grande variedade de espécies de *Leishmania*, de flebótomos vetores e de hospedeiros naturais. Todo esse processo ocorre, geralmente, em ambientes silvestres, porém, como decorrência dos distúrbios causados pelo homem no meio ambiente, são criadas condições para o surgimento de ciclos peridomésticos.

Vários fatores contribuem para a expansão das leishmanioses no mundo. Os frequentes fluxos migratórios, que ocorrem especialmente em regiões da África, Ásia e América do Sul, somados às intensas modificações observadas no meio ambiente, conseqüentes de processos contínuos de desmatamentos, queimadas, construções de barragens e hidrelétricas, assim como esquemas de irrigação empreendidos em diversos países, são premissas que têm proporcionado um aumento substancial de pessoas infectadas, ou expostas a condições propícias ao surgimento de surtos epidêmicos da doença e à perpetuação de áreas endêmicas.

Outro fator que pode ser visto como um agente propagador desse quadro é a redução dos programas de controle dos transmissores da malária no mundo, que tem possibilitado uma elevação na densidade de outros insetos vetores, expondo, assim, populações ao risco de contrair outras doenças.

No norte da África, no Oriente Médio, Ásia Central e Oriental, é observada a forma rural da leishmaniose cutânea, cujo agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) major* Yakimoff & Schokhor, 1914 emend. Bray et al. 1973. As principais espécies de flebótomos responsáveis pela transmissão pertencem ao

subgênero *Phlebotomus* Rondani & Berté. Dentre elas, podemos citar: *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* Scopoli, 1786 que apresenta um destacado papel como vetor da doença ao homem e, também, *P. (P.) duboscqi* (Neveu-Lemaire, 1906) e *P. (P.) salehi* Mesghali, 1965. Outras espécies são suspeitas de estarem envolvidas na transmissão, em virtude do encontro de formas promastigotas no tubo digestivo de fêmeas coletadas no campo. Dentre estas, podemos citar: *P. (Paraphlebotomus) caucasicus* Marzinowski, 1917, *P. andrejevi* Shakirzyanova, 1953 e *P. mongolensis* Sinton, 1928, *P. alexandri* Sinton, 1928, *P. sergenti* Parrot, 1917 e *P. grimmi* Porchinski (Killick-Kendrick, 1990).

Na Índia e nas regiões Central e Sudeste da Ásia a forma urbana de transmissão, designada “Botão do Oriente”, tem como agente etiológico a *L. (L.) tropica* (Wright, 1903) Luhe, 1906. Quanto à espécie responsável pela transmissão ao homem, o *P. sergenti* Parrot, 1917 apresenta hábitos de freqüentar o ambiente peridoméstico e doméstico, mostrando expressivo grau de antropofilia (Killick-Kendrick, 1990).

Em relação à leishmaniose visceral deve-se destacar três tipos de ocorrência da doença. O primeiro tipo é visto na região do Mediterrâneo e Ásia Central, onde o agente etiológico é a *L. (L.) infantum*, Nicolle, 1908, e o cão desempenha um relevante papel no ciclo de transmissão, sendo o mais importante reservatório da moléstia para o homem. A infecção canina é frequentemente letal e aparentemente incurável, fazendo com que esses animais funcionem como hospedeiros amplificadores durante a fase aguda da doença, pois se tornam excelentes fontes de infecção para as fêmeas de flebótomos, que os sugam com avidez (Lainson, 1982). Destaca-se também a participação de alguns tipos de canídeos silvestres (chacal, raposa e lobo) nos ciclos de transmissão, uma vez que, alguns autores reportam o encontro desses animais parasitados (Abranches, 1987). Os roedores também têm

destacado papel como potenciais reservatórios, e apresentam altos índices de infecção. Por essas razões, e pela combinação delas, é que são registrados surtos epidêmicos de leishmaniose visceral nessas áreas. As espécies de flebotomíneos responsáveis pela transmissão da doença na região do Mediterrâneo e parte da Europa são principalmente o *P. (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911 e *P. aiasi* Tonnoir, 1921 (Killick-Kendrick, 1990).

O segundo tipo está relacionado à transmissão que ocorre na África Central (Sudão, Etiópia e Quênia), onde a doença é uma antroponose. Na ausência de processos visceralizantes, podem ser observadas manifestações dérmicas e comprometimento dos gânglios linfáticos nos indivíduos doentes. As espécies de flebotomíneos incriminadas como vetoras são: *P. orientalis* Parrot, 1936 e *P. (Synphlebotomus) martini* Parrot, 1936. O parasita isolado é a *L. (L.) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross 1903.

O último tipo, o calazar indiano, é considerado uma antroponose, e o flebótomo envolvido na transmissão, o *P. (Euphlebotomus) argentipes* Annandale & Bruunetti, 1908, que apresenta hábitos de frequentar o ambiente peridoméstico. O parasita responsável por causar a doença no homem é a *L. (L.) donovani*, sendo encontrado no sangue periférico de pacientes. Na região são verificados surtos epidêmicos que ocorrem, geralmente, em períodos de 10 a 15 anos (Lainson, 1982).

No Novo Mundo, as leishmanioses se dividem em: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que apresenta diversas manifestações clínico-epidemiológicas, e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA).

No Brasil seis espécies de *Leishmania* são causadoras de LTA, e a doença originariamente configurava-se como uma zoonose de animais silvestres, porém, esse aspecto está mais centralizado na Região Amazônica, nos resquícios de Mata Atlântica e nas áreas de floresta primária ou secundária. O homem é,

frequentemente, um hospedeiro acidental, pois é acometido pela doença quando se interpõe ao ciclo que é mantido na natureza.

As áreas de ocorrência estão associadas ao desequilíbrio socioeconômico das populações, o que de certa forma contribui para o agravamento da situação. Hoje, devido aos fluxos migratórios, decorrentes de fatores ligados à ocupação da terra, surgimento de áreas de garimpo e questões ligadas à qualidade de vida das populações, tem sido observado um aumento no número de indivíduos expostos ao risco de infecção.

O processo contínuo de degradação do meio ambiente traz consigo bruscas modificações no perfil florestal e em aspectos climáticos das áreas de ocorrência. Como resultado, nos últimos anos observa-se a elevação do número de pessoas doentes em diversas áreas do território brasileiro, com destaque para o surto epidêmico de LVA assinalado em Teresina, Estado do Piauí (Costa et al. 1990), onde mais de mil casos foram registrados em pouco menos de um ano (Badaró, 1995). Neste aspecto deve ser enfatizada a ocorrência de LVA em algumas cidades brasileiras desde a década de 50, entretanto, nos últimos trinta anos registram-se ciclos de transmissão na periferia das cidades de Santarém (PA), Corumbá (MS), Aracaju (SE), João Pessoa (PB), Natal (RN), São Luís (MA), Belo Horizonte (MG), Montes Claros (MG), Camaçari (BA) e Rio de Janeiro (RJ) (Monteiro et al. 1994; Marzochi & Marzochi, 1997).

No Estado do Rio de Janeiro verifica-se, igualmente, a ocorrência de casos de leishmaniose cutânea na região metropolitana, e em áreas de resquícios de Mata Atlântica. Esse fato é consequência de atividades empregadas para o cultivo da terra, que levam os agricultores dessas regiões a realizar o desmatamento de extensas áreas, intensificando a degradação ambiental de forma contínua e desordenada (Rangel et al. 1990 ; Rangel, 1995).

Ainda no Rio de Janeiro, entre as causas responsáveis pelo surgimento de novos focos de transmissão, pode-se citar a introdução de cães e equinos infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 emend Matta, 1916 em áreas onde não ocorre a transmissão da doença. Isto sugere, em certas circunstâncias, a possibilidade de o parasita encontrar condições ecologicamente propícias onde os flebotomíneos vetores com hábitos ecléticos vivem, e com isso, a transmissão da doença a outros hospedeiros susceptíveis, dentre os quais, o homem, ocorreria (Rangel, 1995).

A LTA pode se apresentar sob três formas: Leishmaniose Cutânea (LC), com lesões cutâneas ulcerativas ou não; a Leishmaniose Mucocutânea (LMC), que se caracteriza clinicamente por lesões que acometem as mucosas do nariz, boca e faringe; e a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), onde as lesões se mostram disseminadas por todo o corpo, principalmente em pacientes que desenvolvem processos anérgicos, decorrente de deficiências no sistema imune, ou em pacientes que realizaram tratamento para leishmaniose visceral.

Na Tabela 1 estão listadas as espécies de *Leishmania* e de flebótomos vetores, associados à transmissão das leishmanioses às populações humanas. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 emend Matta, 1916, apresenta-se distribuída em várias regiões geográficas do território brasileiro, e várias espécies de flebótomos estão incriminadas ou sugeridas como transmissoras deste parasita ao homem e aos animais. Na região Sudeste do Brasil, o flebotomíneo suspeito como vetor é a *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* Lutz & Neiva, 1912, que apresenta um comportamento bastante antropofílico, mostrando-se adaptado a frequentar o ambiente peridomiciliar e domiciliar, e também ambientes modificados e desmatados das zonas rurais. Em áreas dos Estados da Bahia e Ceará, no nordeste do Estado do Paraná em algumas regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato

Grosso do Sul, a espécie de flebotomíneo incriminada na transmissão é a *L. (N.) whitmani* Antunes & Coutinho, 1939. No norte do Brasil a *L. (Psychodopygus) wellcomei* Fraiha et al. 1971 tem sido frequentemente encontrada infectada, apresentando hábitos extremamente antropofílicos. Outro flebotomíneo que também está sugerido como suspeito de ser transmissor dessa leishmânia na Amazônia é *L. (Ps.) complexa* (Lainson & Shaw, 1998).

A *L. (L.) guyanensis* (Floch, 1954) é uma espécie encontrada em ambientes silvestres em áreas da fronteira do Brasil com as Guianas, ao norte do rio Amazonas, e na periferia de Manaus, onde foram registrados casos de leishmaniose cutânea. O flebotomíneo responsável por transmitir a doença ao homem e animais silvestres é a *L. (N.) umbratilis* (Ward & Fraiha, 1973), embora *L. anduzei* (Rozeboom, 1942) também possa estar envolvida nos ciclos de transmissão (Lainson & Shaw, 1998).

A leishmaniose causada pela *L. (V.) lainsoni* (Silveira et al. 1987) é encontrada somente na Região Norte do Brasil, mas, acredita-se que ocorra em outras localidades onde existam os mamíferos hospedeiros e os insetos vetores. O flebotomíneo incriminado na transmissão da doença ao homem é a *L. (Trichophoromyia) ubiquitousalis* (Mangabeira, 1942) (Lainson & Shaw, 1998).

Nos Estados do Pará e Amazonas são registrados casos de LTA causados pela *L. (V.) naiffi* (Lainson & Shaw, 1989). A transmissão está associada ao flebótomo *L. (P.) ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940), entretanto, *L. (P.) paraensis* (Costa Lima, 1941) e *L. (P.) squamiventris* (Lutz & Neiva, 1912) já foram capturadas infectadas em algumas ocasiões. Essas espécies demonstram um elevado grau de antropofilia, sugerindo que possam estar envolvidas na transmissão ao homem (Lainson & Shaw, 1998).

A forma cutânea que ocorre na região localizada ao sul do rio Amazonas é causada pela *L. (V.) shawi* (Lainson et al.1989) e o flebótomo suspeito de transmitir a doença ao homem é a *L. (N.) whitmani*. Porém, diferenças registradas entre os exemplares dessa localidade e o material tipo de *L. (N.) whitmani* e de outras regiões do Brasil, sugerem que estes flebótomos constituam um complexo de espécies (Rangel et al. 1996, Lainson & Shaw, 1998).

A forma difusa da doença é causada pela *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972) ocorre no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai, mas acredita-se que seja encontrada em outros países da região onde o flebótomo vetor se distribua. O principal vetor da leishmaniose difusa é a *L. (N.) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), porém, infecções ocasionais têm sido relatadas em *L. (N.) olmeca* (Vargas & Nájera, 1959) e *L. (N.) reducta* (Feliciangeli, et al 1988), que provavelmente apresentam um papel secundário na ecologia e epidemiologia da doença (Lainson & Shaw, 1998).

A LVA é causada pela *L. (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 e apresenta tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides, onde são observados processos de hiperplasia e hipertrofia desses órgãos.

Tabela 1 - Leishmânias dermatrópicas causadoras de LTA no Brasil e seus potenciais transmissores, segundo Azevedo (1998) com modificações \*.

Espécie	Distribuição Geográfica	Vetor	Citação
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> Vianna, 1911	Pará	<i>Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei</i> Fraiha, Shaw & Lainson, 1971	Lainson et al. 1973; Young & Lawyer 1987; Shaw et al. 1987; Ryan et al. 1987a
	Pará	<i>L. (Ps.) complexa</i> (Mangabeira, 1941)	Souza et al. 1996
	Bahia, Ceará, Paraná, São Paulo e Minas Gerais	<i>L. (Nyssomyia) whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	Pessoa & Coutinho 1941; Pessoa & Barretto 1948; Forattini et al. 1972; Lainson et al. 1979a; Hoch et al. 1986; Ryan et al. 1990; Azevedo et al. 1990a; Queiroz et al. 1994
	Rio de Janeiro e São Paulo	<i>L. (N.) intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Aragão 1922; Forattini & Santos 1952; Forattini et al. 1972; Rangel et al. 1984; Gomes 1986.
	Ceará, São Paulo e Rio de Janeiro	<i>L. migonei</i> (França, 1920)	Pessoa & Pestana 1940; Pessoa & Coutinho 1941; Pessoa & Barretto 1948; Forattini et al. 1972; Araújo-Filho 1979; Rangel et al. 1986; Azevedo et al. 1990b
	São Paulo	<i>L. (Pintomyia) pessoai</i> (Coutinho & Barretto, 1940)	Pessoa & Coutinho 1940; Coutinho 1940; Pessoa & Coutinho 1941; Pessoa & Barretto 1948; Johnson et al. 1963; Forattini et al. 1972
<i>L. (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	Norte do Rio Amazonas	<i>L. (N.) umbratilis</i> (Ward & Fraiha, 1977)	Arias & Freitas 1978; Lainson et al. 1979; Lainson et al. 1981; Christensen et al. 1982; Arias et al. 1985; Ryan et al. 1987b
	Norte do Rio Amazonas	<i>L. (N.) anduzei</i> (Rozeboom, 1942)	Lainson et al. 1976; Arias & Freitas 1977; 1978; Christensen et al. 1982; Arias et al. 1985; Ryan et al. 1987
<i>L. (V.) shawi</i> Lainson et al., 1989	Sul do Rio Amazonas	<i>L. (N.) "whitmani"</i> *	Lainson et al. 1989; Naiff et al. 1991
<i>L. (V.) lainsoni</i> Silveira et al., 1987	Região Amazônica	<i>L. (Trichophoromyia) ubiquitous</i> (Mangabeira, 1942)	Silveira et al. 1991
<i>L. (V.) naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989	Pará e Amazonas	<i>L. (Ps.) paraensis</i> (Costa Lima, 1941)	Arias et al. 1985; Silveira et al. 1991
	Pará e Amazonas	<i>L. (Ps.) ayrozai</i> (Barretto & Coutinho, 1940)	Arias et al. 1985; Lainson et al. 1990; Silveira et al. 1991
	Pará e Amazonas	<i>L. (Ps.) s. squamiventris</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Arias et al. 1985
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Região Norte e Nordeste do Brasil; Minas Gerais, São Paulo e Paraná	<i>L. (N.) flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)	Lainson et al. 1968; Lainson & Shaw, 1998; Arias et al. 1985; Ryan et al. 1987a; Young & Duncan, 1994
		<i>L. (N.) olmeca nociva</i> (Young & Arias, 1982)	
		<i>L. (N.) reducta</i> (Felicangeli et al., 1988)	

\* ver texto.

No Brasil a LVA está incluída na lista de doenças que compõem o Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória (SNDC). É considerada uma doença emergente em franca expansão territorial, com magnitude ascendente. Atualmente, acha-se distribuída em várias regiões do território nacional, inclusive em áreas periurbanas. A LVA apresenta um índice de letalidade alto em crianças, quando não são tratadas precoce e corretamente. Segundo os argumentos estabelecidos pelo SNDC, a notificação deve ser realizada em virtude dos casos humanos tornarem-se marcadores do foco, o que possibilita a investigação oportuna com a realização do diagnóstico de novos casos, evitando-se assim o surgimento de novas infecções (Teixeira et al. 1998).

No Brasil foi verificado um grande aumento na incidência da LVA no período de 1983-1997, e os Estados mais atingidos foram a Bahia, o Piauí, o Ceará e o Maranhão. Entretanto, os Estados que exibiram os mais altos coeficientes de incidência neste período (isto é, a proporção de indivíduos afetados em relação à população) foram Piauí, Roraima, Sergipe e Bahia (Figura 1). A distribuição da LVA nos Estados no ano de 1997, segundo os coeficientes de incidência pode ser observada na Figura 2 (Vieira & Coelho, 1998).

Figura 1 – Casos humanos de leishmaniose visceral. Dados acumulados: participação de cada Estado e proporção em relação à população. Brasil, 1983-1997. (Fonte: FNS/DEOPE/CCDTV/GT Endemias).

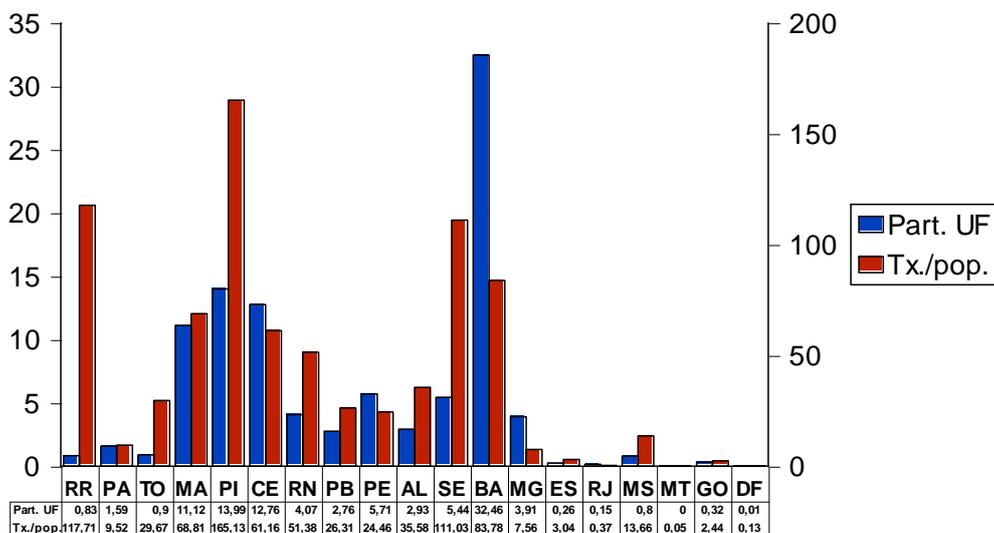
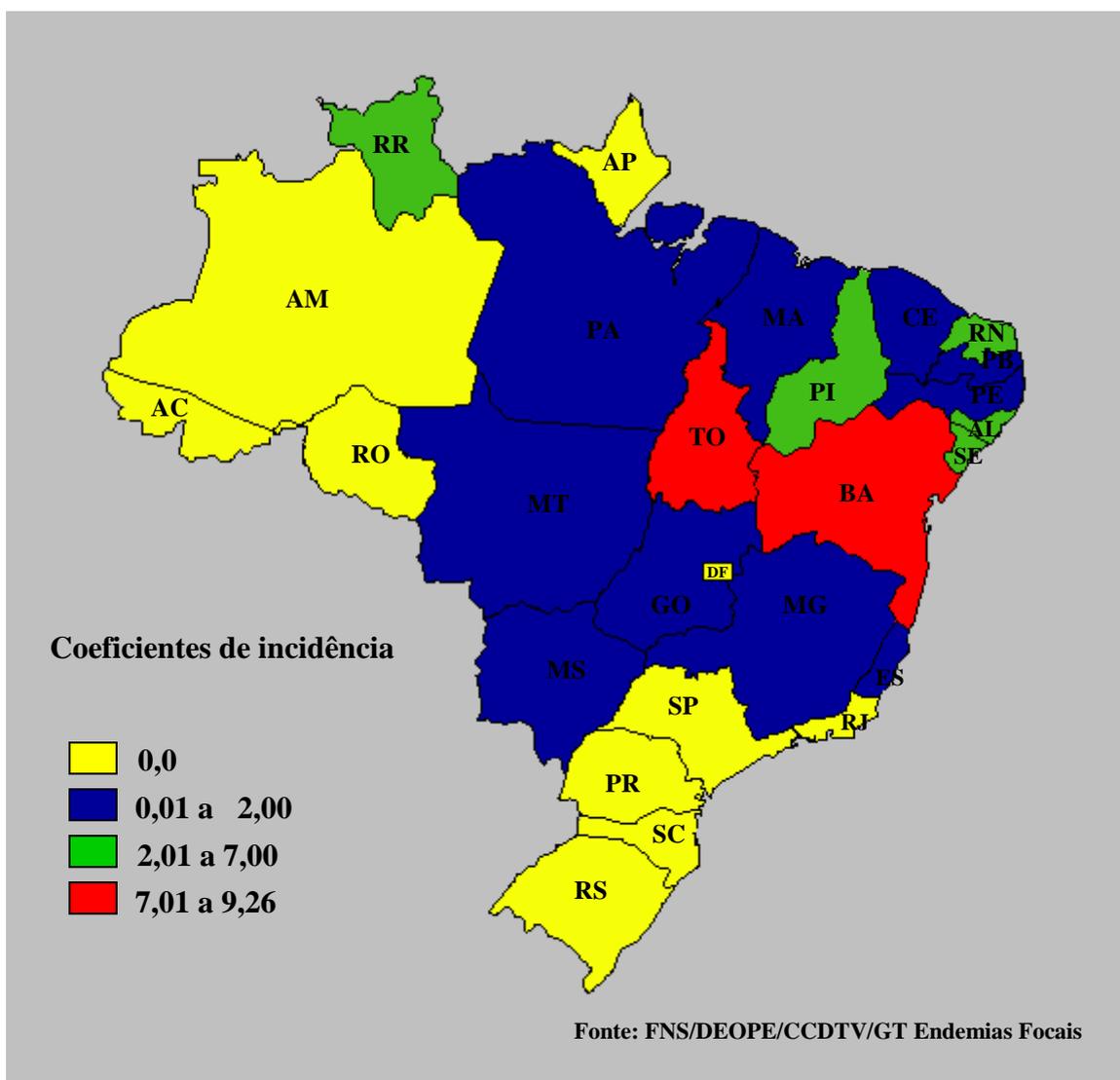


Figura 2- Leishmaniose Visceral – Distribuição dos Estados Brasileiros segundo os coeficientes de incidência. Brasil, 1997.



A espécie incriminada como o principal transmissor da LVA no Brasil é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912. Sua distribuição é ampla, ocorrendo em quase todo o Continente Americano, estendendo-se do México até a Argentina. No Brasil, tem sido o flebotomíneo predominante em quase todos os focos ativos da doença, sugando preferencialmente o homem, o cão e a raposa (Deane & Deane, 1955, Lainson & Shaw, 1998).

Estudos realizados por Deane (1956), no Ceará, revelaram o importante papel epidemiológico desempenhado por *L. longipalpis* na transmissão de leishmaniose visceral na região. Além de ser a espécie de maior densidade, cerca de 97% do total de flebótomos coletados, sua ocorrência foi coincidente com a distribuição dos focos de transmissão da doença. Neste estudo também foram considerados o encontro de formas promastigotas, supostamente leishmânias, no tubo digestivo de fêmeas coletadas na área, e a realização de xenodiagnósticos em pacientes e nos reservatórios domésticos e silvestres (cães e raposas) com LVA.

Evandro Chagas, em expedições realizadas nos Estados do Ceará e Sergipe, registrou aquele que seria o primeiro diagnóstico de caso autóctone em vida de leishmaniose visceral no Brasil. Ele descreveu o encontro de leishmânias em material de punção esplênica, aspectos relacionados à sintomatologia, e também comentou sobre capturas de flebotomíneos realizadas na área, onde *L. longipalpis* foi o único hematófago coletado (Chagas, 1936).

Diversos estudos posteriores foram efetuados (Lopes, 1956; Sherlock & Pessoa, 1966; Sherlock & Guiton, 1969; Ryan et al. 1984; Le Pont & Desjeux, 1985; Ryan & Brazil, 1984) e confirmaram o encontro de fêmeas de *L. (L.) longipalpis* naturalmente infectadas por promastigotas da seção Suprapilária (Lainson & Shaw, 1979).

A capacidade vetorial de *L. longipalpis* foi confirmada após a realização de infecções experimentais com *L. (L.) chagasi*, e de transmissão experimental de hamster para hamster pela picada do vetor (Lainson et al.1977).

A complexidade das formas de transmissão e os diferentes perfis epidemiológicos da doença têm possibilitado a suspeita do envolvimento de outras espécies de flebotomíneos na transmissão, porém, deve ser enfatizado o papel desempenhado pelo flebotomíneo *L. longipalpis* na transmissão da LVA na América do Sul (Deane, 1956; Lainson & Shaw, 1998).

Na Colômbia, *L. evansi* Nuñez-Tovar, 1924 foi a espécie de flebotomíneo mais capturada em um foco de LVA, apresentando um alto grau antropofílico, onde um espécimen foi encontrado infectado naturalmente com formas promastigotas longas. A análise isoenzimática do parasita revelou um perfil similar à *L. (L.) chagasi*. Os autores sugerem que essa espécie de flebótomo pode ser considerada um vetor primário ou um transmissor alternativo de LVA na região (Travi et al. 1990).

No Brasil, no Mato Grosso do Sul, Município de Corumbá, em área de transmissão recente de LVA, *L. cruzi* Mangabeira, 1938 foi a espécie mais abundante em coletas realizadas na região, tanto no domicílio como no peridomicílio das áreas urbanas e bairros periféricos. Outra espécie encontrada na mesma localidade, que se apresentou em alta densidade e freqüente nos domicílios foi *L. forattinii* Galati et al. 1985. Entretanto, os autores assinalam que nas capturas realizadas na área de estudo, os machos de *L. longipalpis* não foram coletados, e ressaltam ainda que as fêmeas dessa espécie e de *L. cruzi* são indistinguíveis morfológicamente (Martins et al. 1984). Em virtude desses registros, eles sugerem que *L. cruzi* possa ter um papel importante na transmissão de LVA na área, sem afastar a possibilidade de *L. forattinii* estar também envolvida no ciclo de transmissão (Galati et al. 1997).

Santos et al. (1998), em Corumbá e Ladário, sugeriram a participação de *L. cruzi* na transmissão de LVA, após observar formas promastigotas na porção anterior do tubo digestivo de 14 fêmeas dissecadas, oriundas do campo. O material foi inoculado em hamsters, mantido em cultura e caracterizado por anticorpos monoclonais como *L. (L.) chagasi*.

Recentemente, foi constatada a ocorrência de *L. longipalpis* na zona urbana de Araçatuba, e em mais 8 municípios da região Oeste do Estado de São Paulo, e de cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral. O inquérito sorológico canino revelou um índice de positividade de 14,4% de um total de 423 amostras analisadas, sendo que em 10 foi confirmado o diagnóstico para *L. (L.) chagasi*, através da técnica de PCR (Galimberti et al. 1999; Tolezano et al.1999).

## **2- MEDIDAS DE CONTROLE:**

### **2.1- Relevância:**

Em virtude da grande prevalência da leishmaniose no mundo, a busca por medidas de controle tem sido objeto de estudos empreendidos em vários centros de pesquisa. As linhas de investigação abrangem estudos tanto em nível da biologia do inseto, como do desenvolvimento de vacinas, ou relacionados à aplicação de sofisticadas técnicas moleculares na tentativa de bloquear a infecção no vetor. Entretanto, o controle da doença é extremamente complexo, devido às diferentes espécies de *Leishmania* existentes, suas diversas manifestações clínicas, e o estado imune de pacientes. Outro fator preponderante está relacionado às diferentes espécies de flebótomos vetores e seus habitats, e a possibilidade de se adaptarem a diversas condições ambientais, muitas vezes alteradas pela ação do homem.

### **2.2- Preceitos de Controle:**

Os conceitos que norteiam a aplicação de medidas de controle, estabelecidas pelo Programa de Controle de Leishmaniose Visceral (PCLV) da Fundação Nacional de Saúde (FNS) objetivam a interrupção dos elementos que participam do ciclo epidemiológico da doença: o parasito, o reservatório, e, principalmente, o inseto vetor. As medidas práticas preconizadas para o controle da leishmaniose no país estão direcionadas, num primeiro momento, ao tratamento do paciente, o que deve ser feito o quanto antes, reduzindo com isso a letalidade. Nesse sentido, devem ser intensificados o aperfeiçoamento de métodos de diagnóstico precoce e o tratamento oportuno da doença, incluindo a reciclagem dos profissionais de saúde que estão envolvidos nos programas de controle.

É também fundamental o emprego de medidas relacionadas ao reservatório. Estas consistem na identificação, diagnóstico precoce e eliminação (o mais rápido

possível) desses animais, reduzindo conseqüentemente a possibilidade das fêmeas de flebótomos adquirirem a infecção. Quando o índice de positividade canino se mantiver em até 1%, recomenda-se a vigilância epidemiológica. Em áreas onde esse percentual for ultrapassado, a orientação é a imediata eliminação dos cães positivos da área. A detecção da prevalência canina e a eliminação dos cães infectados têm como objetivo interromper a cadeia epidemiológica. Deve-se realizar estudos entomo-epidemiológicos no sentido de fazer o levantamento da fauna de flebotomíneos e conhecer aspectos relacionados à biologia das possíveis espécies vetoras, determinando assim, uma maior abrangência da problemática. Ao se confirmar a presença da espécie vetora na área de investigação, a medida indicada é a aplicação de inseticidas de ação residual tanto no intradomicílio como nas áreas peridomiciliares. Nas regiões urbanas, quando registrados surtos epidêmicos e níveis elevados na densidade do inseto vetor, sugere-se a aplicação de inseticidas em Ultra Baixo Volume (UBV) nas residências. A divulgação de elementos relacionados à educação e à saúde das comunidades e sua participação nos programas de controle são fatores fundamentais para motivar uma maior difusão de informações. A orientação das populações humanas também contribui para evitar o surgimento de novos casos e para a eficácia das ações de controle. As medidas assinaladas anteriormente são pontos que constam do Manual de Diretrizes e Técnicas do Diagnóstico, Tratamento e Controle de Reservatórios e Vetores do Calazar (Monteiro et al. 1994).

### **2.3- Inseticidas:**

Com o advento dos novos inseticidas, surgiu a possibilidade de se utilizar uma metodologia que não apenas tornasse plausível o controle de doenças transmitidas por insetos hematófagos, como também a erradicação delas em

algumas regiões. O emprego de inseticidas sintéticos tem sido hoje a mais freqüente estratégia utilizada no combate e controle dessas doenças.

A utilização contínua de produtos químicos pode ocasionar sérias consequências ao meio ambiente, inclusive a contaminação de alimentos. Além disso, o emprego sistemático desses produtos pode, em certas circunstâncias, desencadear o surgimento de populações refratárias e/ou resistentes a esses produtos, gerando sérios danos do ponto de vista epidemiológico.

Medidas de racionalização na aplicação de inseticidas, através de seu uso alternado e integrado por meio do controle físico e biológico são recomendados, e têm o intuito de minimizar o surgimento ou o agravamento de resistência em populações de vetores (Brown, 1986).

Outros métodos têm sido utilizados com o objetivo de fornecer um espectro mais amplo de controle desses artrópodes, dentre eles, o emprego de outros inseticidas químicos (hormônios juvenis, inibidores da formação de quitina e produtos de origem vegetal) e também, o controle biológico (vírus, bactérias, fungos, etc...) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

#### **2.4- Medidas Alternativas de Controle:**

Diante do quadro de agravo em que as populações das áreas de ocorrência de casos de leishmaniose estão submetidas, da complexidade dos ciclos de transmissão, do emprego de quimioterapias que apresentam sérios efeitos colaterais, atualmente é imprescindível encontrar novas abordagens para o controle dessa importante moléstia e realizar estudos com ênfase no conhecimento mais detalhado dos mecanismos moleculares da interação parasito-hospedeiro invertebrado.

Uma questão relevante na busca de alternativas de controle das leishmanioses está relacionada com aspectos básicos do ciclo biológico dos flebotomíneos vetores, uma vez que pouco se conhece sobre os criadouros naturais desses dípteros. Ao contrário dos mosquitos, onde o emprego de medidas de controle sobre as formas imaturas pode ser realizado, os flebotomíneos criam-se em ambientes terrestres, em matéria orgânica em decomposição, o que de certa forma, inviabiliza o seu controle nesta etapa do seu desenvolvimento. Por essa razão, as medidas preconizadas para o controle das leishmanioses, no que tange o hospedeiro invertebrado, estão voltadas num primeiro momento para o inseto adulto. O estudo da biologia de vetores, e de sua interação com os patógenos, possibilita conhecer vários sistemas fisiológicos ou celulares e identificar formas de interferir em seus ciclos vitais (Billingsley, 1994).

Uma medida alternativa ao controle de doenças transmitidas por artrópodes seria o emprego, nos reservatórios vertebrados, de vacinas dirigidas contra os vetores, capazes não só de diminuir a viabilidade como também interferir com sua capacidade de transmitir doenças. Extratos derivados de tecidos de artrópodes e também de compostos da saliva têm sido empregados na tentativa de desenvolver vacinas contra alguns artrópodes, tais como: carrapatos, piolhos, pulgas, mosquitos e flebótomos. Esta metodologia apresenta ainda um potencial de controle mais longo e eficaz, sem oferecer riscos de contaminação por resíduos tóxicos às populações humanas e ao ambiente (Kay & Kemp, 1994). O aparelho digestivo dos insetos hematófagos, especialmente o intestino médio, é um importante alvo potencial para a atividade de anticorpos e drogas ingeridas com sangue. Esses agentes podem afetar a biologia do inseto, causando alterações nas taxas de fecundidade e mortalidade.

É importante notar que esta estratégia é distinta daquela em que se busca controlar doenças através de vacinas que interferem no desenvolvimento dos parasitas causadores de doenças, bloqueando sua transmissão.

A possibilidade de vacinar hospedeiros vertebrados contra picadas de vetores hematófagos requer a compreensão de particularidades relativas ao hábito alimentar dos diferentes artrópodes: enquanto alguns mantêm contato prolongado com seus hospedeiros quando realizam o repasto sanguíneo (carrapatos, piolhos, pulgas, etc...), outros, como mosquitos, alguns outros dípteros e hemípteros, por exemplo, permanecem em contato com hospedeiro por breves períodos de tempo, durante o repasto.

A inoculação de produtos das glândulas salivares oriundos de artrópodes vetores através da alimentação sanguínea, ou a injeção, no hospedeiro vertebrado, de extratos do vetor, estimulam um amplo espectro de respostas imunes, ainda não muito bem caracterizadas (Wikel, 1982). Por outro lado, processos alérgicos resultantes da picada de insetos, podem ser desencadeados (Kay & Kemp, 1994).

Desde muito tempo já se preconizava o uso de uma metodologia de controle que compromettesse aspectos da biologia de artrópodes, alterando sua fecundidade e sobrevivência, através da imunização de hospedeiros vertebrados com extratos de órgãos internos dos vetores invertebrados. Dados relativos a alguns destes experimentos estão resumidos na Tabela 2.

O primeiro estudo neste sentido foi realizado por Trager (1939<sup>a</sup>), que alimentou larvas do carrapato *Dermacentor variabilis* Say em cobaias. Ele observou que na 1<sup>a</sup> alimentação a quase totalidade das larvas ingurgitaram, enquanto nos repastos subsequentes houve uma drástica redução nesse número. Variações no grau de ingurgitamento das larvas também foram observados, sugerindo que

cobaias podem desenvolver imunidade quando expostas a infestações por larvas de carrapatos.

Trager (1939<sup>b</sup>) tentou induzir resistência contra a mesma espécie de carrapato, através de injeções subcutâneas, em cobaias e em coelhos, de extratos de glândula cefálica, glândula salivar, trato digestivo e corpo total (carcaças) de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas. Extratos de glândula salivar de fêmeas adultas não alimentadas também foram utilizados. O autor observou resultados semelhantes àqueles obtidos através de alimentações sucessivas de larvas em um mesmo hospedeiro. Neste ensaio, os soros dos animais inoculados com *D. variabilis* foram também testados através da reação de fixação de complemento, apresentando reação positiva.

Os estudos realizados com carrapato têm mostrado relativo sucesso, principalmente aqueles observados com *Boophilus microplus* Canestrini. Alguns grupos de pesquisa têm concentrado esforços no sentido de desenvolver uma vacina comercial que proteja o gado de infestações por carrapatos. Os ensaios imunológicos de controle utilizando carrapatos e insetos mostram algumas semelhanças em seu desenho experimental. Entretanto, os resultados obtidos até então mostram que antígenos derivados de extratos totais, tubo digestivo e saliva podem desencadear efeitos deletérios mais eficazmente em carrapatos do que em insetos. Esse fato decorre das diferenças fisiológicas que esses artrópodes apresentam em seu ciclo de vida. A primeira delas está relacionada ao hábito alimentar, uma vez que carrapatos realizam seu repasto sanguíneo por períodos prolongados nos hospedeiros, possibilitando maior efetividade do sangue ingerido, que pode levá-los à morte. Por outro lado, os carrapatos digerem o sangue dentro das células, contrariamente aos insetos, que secretam no interior do lúmen, enzimas digestivas para destruir os anticorpos. Vale destacar que os insetos secretam a

matriz peritrófica, que envolve o sangue ingerido, isolando-o da superfície do epitélio (Jacobs-Lorena & Lemos, 1995).

Tabela 2 – Efeito de anticorpos dirigidos contra extratos de diferentes órgãos de artrópodes, sobre alguns aspectos da biologia de vetores.

Ártrópode / Extratos	Vertebrado	Aceitação do repasto	M	F	I	Referência
<i>D. variabilis</i> (carrapato)	Cobaia/Coelho					Trager (1939 <sup>a,b</sup> )
Saliva		+	+	nd	nd	
Carcaça		+	+	nd	nd	
<i>B. microplus</i>	Boi	+				Johnston et al. (1986)
<i>B. microplus</i>	Boi	+				Kemp et al. (1986, 1989)
<i>B. microplus</i> (BYC)	Boi	+	+	+		Vaz Jr et al. (1998)
<i>An. quadrimaculatus</i> (açúcar)	Coelho	+				Dubin et al. (1947)
<i>An. stephensi</i> (açúcar)	Coelho					Alger & Cabrera (1972)
Carcaça (sobrenadante)			+/-	nd		
Carcaça (sedimento)			-	nd		
Tubo Digestivo			+	nd		
<i>An. stephensi</i> (sangue)	Camundongo					Almeida & Billingsley (1998)
Cabeça			+	-		
Tubo Digestivo			+	+/-		
Ovário			+	-		
Corpo Gorduroso			-	+		
<i>An. stephensi</i> (tubo digestivo)	Camundongo				+	Lal et al. (1994)
<i>An. farauti</i>	Camundongo					Ramasamy & Ramasamy (1990)
Tubo Digestivo (açúcar)			+			
Tubo Digestivo(sangue)			-			
<i>An. fesselatus</i> (açúcar)	Coelho					Ramasamy et al. (1992)
Cabeça/Tórax			-	+		
Tubo Digestivo			-	+		
Abdômen			-	+		
<i>An. fesselatus</i> (sangue)	Camundongo					Srikrishnaraj et al.(1993)
Cabeça/Tórax				+		
Tubo Digestivo						
Abdômen						
<i>Ae. aegypti</i> (açúcar)	Coelho/Cobaia					Sutherland & Ewen (1974)
Carcaça			-	+		
<i>Ae. aegypti</i> (açúcar)	Camundongo					Hatfield (1988)
Carcaça (solúvel)			+	-		
Tubo Digestivo (solúvel)			+	-		
<i>Ae. aegypti</i> (sangue)	Coelho					Ramasamy et al. (1988)
Cabeça/Tórax			-	+		
Tubo Digestivo			-	+		
Abdômen			-	+		
<i>Ae. aegypti</i> (sangue)	Coelho					Ramasamy et al. (1990)
Cabeça/Tórax				+		
Tubo digestivo				+		
Abdômen				-		
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Coelho					Schlein & Lewis (1976)
Cutícula			+	nd		
Músculo torácico			+	nd		
Abdômen			+	nd		
“Wing buds”			+	nd		
<i>Glossina morsitans</i>	Coelho					Nogge (1978)
Carcaça			+/-	+/-		
<i>P. duboscqi</i> (sangue)	Hamsters					Ingonga et al. (1996)
Tubo digestivo		+	+			
Corpo total		+	-			
<i>P. argentipes</i> (saliva)	Hamsters	+	+		+	Ghosh & Mukhopadhyay (1998)

M- Mortalidade F- Fecundidade I- Infectividade + efeito significativo +/- efeito brando - sem efeito nd não determinado

Johnston et al. (1986) demonstraram que a vacinação do gado com extratos de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *B. microplus* reduziu em até 70% o número de carrapatos que se fixavam no gado, mostrando uma grande efetividade neste esquema. O fracionamento desses extratos e testes realizados com gado vacinado, possibilitou a purificação de um antígeno eficaz (Bm86).

Kemp et al. (1986) observaram que diferentes fases do ciclo de vida do carrapato são afetadas pela vacinação do gado com extratos de *B. microplus*. Os autores verificaram redução no número de fêmeas adultas e de larvas ingurgitadas, quando essas realizaram o repasto sanguíneo no gado vacinado e observaram danos nas células do tubo digestivo dos vetores. A eficácia desse esquema ocorreu em virtude da espécie em questão realizar seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro, possibilitando assim uma maior efetividade dos anticorpos ingeridos (Kemp et al. 1989)

Vaz Junior et al. (1994), infestando experimentalmente o gado com larvas de *B. microplus* verificaram antígenos comuns presentes em diferentes tecidos do carrapato, neste ensaio, os soros produzidos foram caracterizados por ELISA e Western blot. Quantificando a passagem de imunoglobulinas do gado para a hemolinfa de *B. microplus*, durante o repasto sanguíneo, e determinando a atividade de anticorpos do hospedeiro, Vaz Junior et al.(1996) observaram através do teste de ELISA, que 2% da imunoglobulina bovina estava presente na hemolinfa do carrapato. A presença de anticorpos bovinos na hemolinfa de carrapatos alimentados em gado imunizado com antígenos de ovos purificados do artrópode foi detectada por Western blot, sugerindo que anticorpos funcionais estavam presentes na hemolinfa de carrapatos ingurgitados até pelo menos 48h depois de se destacarem do hospedeiro.

Toro-Ortiz et al. (1997) avaliaram o efeito de quatro anticorpos monoclonais (BrBm1 a 4) dirigidos contra extratos de embrião e de tubo digestivo obtidos de *B. microplus* ingurgitados. Os autores verificaram que BrBm1 reagiu com diferentes estádios e tecidos do carrapato, BrBm2 reconheceu apenas antígenos presentes no tubo digestivo e BrBm3 e BrBm4 reconheceram a Vitelina, proteína majoritária do ovo. A inoculação desses anticorpos em fêmeas ingurgitadas do carrapato resultou em um decréscimo na postura quando BrBm1 e BrBm2 foram utilizados. Este estudo sugere que é possível avaliar efeitos de anticorpos anti-carrapatos antes de realizar experimentos de vacinação.

Vaz Jr et al. (1998) verificaram a capacidade de outra proteína a “*Boophilus* Yolk pro-Catepsin” (BYC) de induzir proteção do gado contra infestações por *B. microplus* através não só da vacinação experimental, como também da inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em fêmeas de carrapato ingurgitadas. No primeiro caso, houve proteção parcial contra o carrapato, e os níveis de anticorpos específicos foram detectados até 11 meses em bois acompanhados em testes de campo. A inoculação de anticorpos em fêmeas de carrapatos resultou em redução dose-dependente da postura e da sobrevivência das fêmeas inoculadas.

Apesar dos resultados ainda pouco conclusivos observados com insetos, diversos grupos estão empenhados em encontrar meios de controlar ou mesmo interromper a transmissão de doenças para o homem e animais, utilizando-se para isso de novas abordagens de controle. Alguns estudos já realizados, relatam experiências realizadas com espécies de mosquitos (*Aedes*, *Anopheles* e *Culex*) e moscas (*Glossina* e *Stomoxys*).

Alger & Cabrera (1972) verificaram que fêmeas de *An. stephensi* Liston (1901) alimentadas em coelhos previamente imunizados com sobrenadante de corpo total de mosquitos, sedimento de corpo total e porções do tubo digestivo desta

espécie, apresentaram taxa de mortalidade mais alta do que aquelas alimentadas em coelhos controle. Apesar do trabalho de Dubin et al. (1947) (Tabela 2), este é considerado o primeiro relato de variações em aspectos fisiológicos de insetos decorrentes de imunizações do vertebrado.

Estes resultados foram confirmados por Almeida & Billingsley (1998), que imunizaram camundongos com diferentes extratos de *An. stephensi* (cabeça, tubo digestivo, ovários e corpo gorduroso) e observaram que fêmeas alimentadas nos animais imunizados apresentaram significativa redução na longevidade e fecundidade, e aumento na mortalidade, quando comparadas com fêmeas controle. A análise dos soros, através dos testes de ELISA e Western blot, indicou reatividade e reconhecimento de proteínas específicas (Almeida & Billingsley, 1999).

Lal et al. (1994) investigaram o efeito de anticorpos anti-mosquitos em fêmeas de *An. stephensi* Liston (1901) infectadas com *Plasmodium berghei* Vinckey. Os autores observaram uma redução no número de oocistos quando as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em camundongos imunizados com tubo digestivo de fêmeas alimentadas com açúcar. Neste ensaio, os anticorpos contra tubo digestivo parecem ter inibido o desenvolvimento e/ou a translocação dos esporozoítas nas glândulas salivares.

O efeito de anticorpos anti-mosquitos sobre a infectividade de vetores foi avaliado em *An. farauti* Laveran (1902) por Ramasamy & Ramasamy (1990). Os autores utilizaram fêmeas alimentadas em camundongos infectados com *P. berghei*. Observou-se um decréscimo no número de oocistos de fêmeas alimentadas em camundongos imunizados com tubos digestivos de fêmeas alimentadas com açúcar, quando comparadas ao das fêmeas do grupo controle. Houve uma redução na taxa de mortalidade e os índices de infectividade das fêmeas se mostraram baixos, quando comparados com fêmeas do grupo controle. Neste caso, a redução na

mortalidade foi atribuída à proteção, pelos anticorpos, da parede do tubo digestivo contra a penetração de oocisto. Antígenos derivados de fêmeas alimentadas com sangue foram pouco efetivos em relação a esses aspectos.

Fêmeas de *An. tessellatus* Theobald (1901), quando alimentadas em coelhos imunizados com tecidos de mosquitos da mesma espécie, apresentaram redução na taxa de postura, porém sem afetar a mortalidade. Anticorpos dirigidos contra *An. tessellatus* parece ter algum efeito sobre *Culex quinquefasciatus* Say (1923), uma vez que fêmeas desta espécie apresentaram aumento na taxa de mortalidade quando realizaram repasto sanguíneo nos coelhos acima mencionados. Neste caso, porém, não foram detectados efeitos sobre o número de ovos (Ramasamy et al.1992).

Sutherland & Ewen, (1974) alimentaram fêmeas de *Ae. aegypti* em coelho e cobaia previamente imunizados com extratos totais de mosquitos desta espécie e observaram efeito significativo sobre a taxa de fecundidade das fêmeas. Os autores, porém, não registraram efeito algum sobre *Cx tarsalis* após alimentação nos coelhos imunizados com *Ae. aegypti*, sugerindo especificidade na resposta, diferentemente do que foi observado por Ramasamy et al. (1992) com relação a *Cx. quinquefasciatus* e anti-soros dirigidos contra *An. tessellatus*.

Ramasamy et al. (1988) também submeteram fêmeas de *Ae. aegypti* à alimentação em coelhos imunizados com diferentes extratos (cabeça/tórax e abdômen). Os autores obtiveram resultados equivalentes a Sutherland & Ewen (1974), pois observaram que as fêmeas apresentaram uma redução na taxa de fecundidade na 1ª postura de ovos e um decréscimo na viabilidade da prole. Variações na aceitação do repasto e na mortalidade não foram verificadas. Da mesma forma, Srikrishnaraj et al. (1993) observaram que a fecundidade de fêmeas de *An. tessellatus* foi reduzida em cerca de 29%, ao realizarem o repasto sanguíneo

em camundongos imunizados com extratos de cabeça-tórax, tubo digestivo e abdômen de mosquitos da mesma espécie.

Hatfield (1988), também usando fêmeas de *Ae. aegypti*, avaliou os efeitos de anticorpos dirigidos contra corpo total ou tubo digestivo de mosquitos produzidos por camundongos sobre este mosquito. O autor relatou que em ambos os casos, as fêmeas alimentadas nos animais imunizados apresentaram uma taxa de mortalidade maior, o que foi correlacionado ao título e à especificidade dos anticorpos, definidos, respectivamente, através das técnicas de ELISA e de imunodifusão. Neste estudo não foram observados inibição de repasto sanguíneo ou, contrariamente ao que havia sido relatado por Sutherland & Ewen (1974), decréscimo da fecundidade.

Ramasamy et al. (1990) relataram que é possível obter proteção parcial de fêmeas de *Ae. aegypti* aos vírus da encefalite (Ross River e Murray Valley), após imunização de coelhos com componentes de tubo digestivo e cabeça-tórax de fêmeas alimentadas com uma preparação de sangue mais as linhagens dos vírus.

Schlein & Lewis, (1976), utilizando tecidos das moscas dos estábulos *Stomoxys calcitrans* (cutícula e células hipodermis aderidas, músculos torácicos, tecidos abdominais e das asas) para imunizar coelhos, verificaram efeitos sobre a mortalidade e fecundidade das moscas após alimentação nos hospedeiros imunizados, entretanto, quando colocaram moscas tsé-tsé *Glossina morsitans morsitans* para realizar o repasto nos coelhos imunizados com cutícula e tecidos das asas, houve aumento na mortalidade em um experimento, mostrando que os antígenos das moscas dos estábulos apresentaram reação inespecífica. Nogge (1978) imunizou coelhos com extratos totais de *G. morsitans morsitans* e registrou um pequeno aumento na taxa de mortalidade e um discreto declínio na taxa de fecundidade dos insetos.

O primeiro estudo utilizando-se flebotomíneos foi realizado por Ingonga et al.(1996) que avaliaram aspectos biológicos de fêmeas de *P. duboscqi* alimentadas em hamsters imunizados com extratos de tubo digestivo e sobrenadante de corpo total. Os autores verificaram um aumento na taxa de mortalidade em diferentes dosagens do antígeno (20 µl/ml, 40µl/ml e 60µl/ml) e um decréscimo na fecundidade das fêmeas alimentadas em hamsters imunizados com o primeiro antígeno e sugerem que estes interferem na sobrevivência.

Ghosh & Mukhopadhyay (1998) realizaram um estudo avaliando o efeito de anticorpos anti-saliva de *P. argentipes* produzido em hamsters, através de repastos sucessivos do flebotomíneo. Os autores observaram que o percentual de fêmeas ingurgitadas diminuiu, enquanto a taxa de mortalidade aumentou no decorrer do esquema de alimentação. Resultados similares na taxa de mortalidade foram obtidos quando fêmeas do flebótomo alimentaram-se com sangue imune de hamster, através de membrana artificial. A adição de uma suspensão de sangue mais *L. (L.) donovani* ao soro imune resultou em redução da migração e inibição do desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo das fêmeas sobreviventes.

Essas observações permitem sugerir que estudos empregando essa abordagem podem se constituir numa ferramenta muito útil para o controle de artrópodes vetores, reduzindo assim o número de pessoas que se infectam anualmente em todo o mundo. Entretanto, são necessários esforços contínuos e investigações mais pormenorizadas no sentido de se obter um controle mais efetivo das doenças transmitidas por artrópodes.

Diante disso, e devido à escassez de estudos empregados com flebotomíneos dentro dessa abordagem, nos sentimos estimulados em realizar a presente análise, com o intuito de verificar variações que possam ocorrer em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com diferentes extratos de

flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas de fêmeas da mesma espécie de flebotomíneo. O estudo em questão se constitui no primeiro a utilizar extratos derivados de flebotomíneos do Continente Americano e foi realizado com uma espécie que apresenta um papel epidemiológico fundamental na transmissão da LVA na região. Com isso, acreditamos em poder contribuir de alguma maneira para uma maior compreensão dos diversos aspectos que envolvem esta abordagem, especialmente aqueles que estão direcionados à obtenção de vacinas derivadas de tecidos ou extratos específicos de flebótomos.

## **OBJETIVOS**

### **1- Geral:**

Verificar a influência de anticorpos dirigidos contra diferentes extratos de fêmeas de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), em estados nutricionais distintos, e de anticorpos obtidos após exposição a sucessivas picadas do flebotômíneo, sobre aspectos da biologia desta espécie relacionados com a capacidade vetorial.

### **2- Específicos:**

2.1- Verificar a influência dos anticorpos anti-flebótomos sobre a alimentação de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, mantidas em laboratório, em coelhos imunizados e acompanhamento dos seguintes parâmetros biológicos:

- a- Aceitação do repasto sangUíneo.
- b- Mortalidade / Longevidade.
- c- Eficiência da postura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1- Procedência dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* utilizados nos experimentos:**

- a- Município de Jacobina, Estado da Bahia.
- b- Gruta da Lapinha, Município de Lagoa Santa, Estado de Minas Gerais.

#### **1.1- Justificativa:**

Para realização do estudo em questão foi necessário dispor de um número expressivo de flebótomos, como havia sido estabelecido no desenho experimental.

Em virtude de problemas técnicos ocorridos em nosso insetário, a colônia de *L. longipalpis*, originária da Gruta da Lapinha, mantida há 12 anos em nosso laboratório, encontrava-se muito aquém da sua produtividade, resultado de uma perda abrupta de flebótomos. Esse fato comprometeu totalmente a programação estabelecida, e inviabilizou o início das atividades. Em virtude disso foi necessária a realização de excursões ao campo, com o objetivo de obter material para, inicialmente estabelecer uma criação de flebótomos, e no momento seguinte, obter os insetos para efetivamente dar início à parte experimental.

É importante ressaltar que o estudo em questão não objetivava realizar comparações entre o material das duas áreas, uma vez que a finalidade era verificar variações nos parâmetros biológicos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e coelho exposto a sucessivas picadas experimentalmente. Vale ainda destacar que foram realizadas cinco avaliações experimentais com as fêmeas de *L. longipalpis*, sendo que as duas iniciais foram executadas simultaneamente com flebótomos das duas localidades em questão (Jacobina e Lapinha). Este fato ocorreu em virtude da disponibilidade de

insetos no momento da realização dos experimentos. As avaliações subsequentes foram executadas com insetos provenientes exclusivamente da Gruta da Lapinha. Apesar disso, não verificamos diferenças entre os flebotomíneos oriundos das duas localidades que possam ser consideradas, e, por essa razão, os dados das avaliações foram analisados conjuntamente.

Estudos morfológicos, morfométricos e isoenzimáticos realizados com diferentes populações de *L. longipalpis* mostraram tratar-se de uma única espécie, não se constituindo em um possível complexo de espécies no Brasil (Azevedo, 1998). Apesar do estudo em questão não utilizar flebótomos provenientes de Jacobina, mas sim da Gruta da Lapinha, além de outras populações do Nordeste do Brasil (Ilha de Marajó-PA, Ilha de São Luís-MA, Canindé-CE e Natal-RN), não acreditamos que a dupla procedência do material usado em nossos experimentos possa ter alguma influência nos resultados obtidos.

A escolha das localidades para capturar *L. longipalpis* se deveu a questões relacionadas à frequência e à densidade dessa espécie, além do apoio logístico que foi conseguido junto a outros grupos de pesquisa. A Gruta da Lapinha é uma localidade onde pesquisadores recorrem para coletar *L. longipalpis* em apreciável número, e que tem se configurado como localidade preferencial aos que pretendem iniciar uma criação dessa espécie. Jacobina é sabidamente uma região endêmica para LVA, e diversos estudos já foram realizados, abrangendo tanto aspectos epidemiológicos da doença, quanto aqueles relativos à fauna de flebótomos.

## **2- Obtenção e manutenção, em insetário, dos exemplares de *Lutzomyia longipalpis*:**

As capturas dos flebotomíneos foram realizadas através do uso de armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia & Chamberlain, 1962) (Figura 3). As coletas

executadas nas duas áreas descritas acima foram iniciadas no crepúsculo vespertino. As armadilhas luminosas permaneceram ligadas aproximadamente das 18 horas até as 8 horas da manhã seguinte.

### **2.1- Espécimes provenientes de Jacobina:**

Nas capturas efetuadas em Jacobina, os insetos coletados foram mantidos vivos em gaiolas de tecido náilon (Barraud, 1929) (Figura 4) e transportados até o laboratório. A metodologia de transporte e manutenção dos espécimes foi baseada na descrita por Rangel et al. (1985). Ainda no campo, foi oferecida solução açucarada (açúcar comercial + água destilada até alcançar a consistência de um xarope), colocada em uma pequena tampa plástica forrada com um pedaço de flanela. As gaiolas foram montadas em uma estrutura de ferro coberta por flanela umedecida em água destilada, envoltas em saco plástico preto. Todo o aparato foi acondicionado em caixa de isopor forrada com flanelas embebidas em água destilada, com o intuito de assegurar a manutenção do nível de umidade ótimo, necessário à sobrevivência dos flebotomos.



Figura 3 – Armadilha luminosa CDC utilizada nas coletas de flebotomos nas localidades de Jacobina (BA) e Gruta da Lapinha – Lagoa Santa (MG).

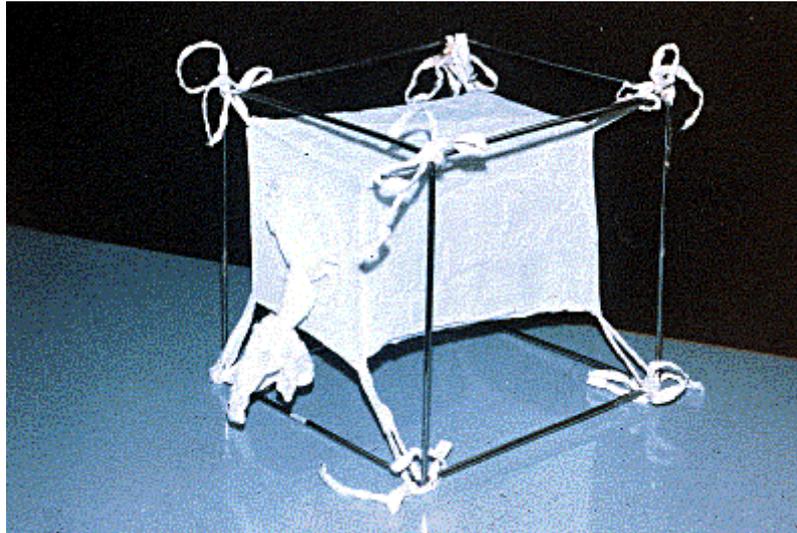


Figura 4 – Gaiola em tecido náilon (e armação metálica) usada para o transporte de flebotomíneos ao laboratório.

No laboratório de apoio montado na localidade onde as coletas foram realizadas, um hamster, previamente anestesiado com Thionembutal 1g tiopental sódico – Laboratório Abbott, diluído em solução salina (0,85% NaCl) na dosagem de 0,25 mg/kg, era colocado dentro da gaiola para que as fêmeas de flebotomos realizassem o repasto sanguíneo. O hamster, sob efeito do anestésico, era imobilizado em um envelope de tela de arame flexível, e permanecia dentro da gaiola até que as fêmeas completassem o repasto.

Posteriormente, retirava-se o hamster da gaiola, e, a seguir, as fêmeas ingurgitadas eram individualizadas em pequenos tubos de polietileno (Figura 5). No fundo dos tubos havia uma pequena rodela e sobre esta uma sanfona, ambas de papel filtro, que funcionavam como substrato de pouso para o inseto. Na borda superior, o tubo era coberto por um pequeno pedaço de tecido de náilon, e fixado por uma tampa plástica com um orifício central, sobre o qual era colocada uma bolinha de algodão embebida em solução açucarada. Os tubos foram acondicionados numa bandeja de aço inox com alça, contendo vários orifícios na

face inferior, e mantidos em caixas plásticas vedadas (30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 30 cm de altura) forradas com papel filtro umedecido com solução anti-micótica (composta de 1 litro de água destilada e duas gotas de solução comercial anti-fúngica para aquário de peixes). Todo o aparato foi mantido no interior de caixas de isopor, na ausência de luz, e transportado até o Laboratório de Transmissores de Leishmaniose e Oncocercose, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Já no laboratório, ao se observar as posturas, os ovos foram recolhidos individualmente através de uma agulha de 40/12 com a ponta do bisel levemente encurvada (em forma de concha). A seringa usada para esse procedimento continha solução anti-fúngica. Os ovos recolhidos foram contados e ejetados para potes plásticos, forrados na face interna com gesso estuque, que permitia a manutenção da umidade. O pote plástico foi coberto por tampa plástica forrado igualmente com gesso (prato de xaxim), constituindo-se em num ambiente propício para o desenvolvimento das formas imaturas. Todo o conjunto foi colocado em caixa plástica forrada com papel filtro umedecido com solução anti-micótica, já mencionada anteriormente.

Os potes contendo as formas imaturas dos flebótomos foram observados em dias alternados durante a semana, com o intuito de controlar o nível de umidade, a proliferação de fungos e também de oferecer alimento às formas imaturas (ração comercial de peixe de aquário, Vitormônio<sup>®</sup> + Complexo de Aminoácidos, Amino Power<sup>®</sup> (Souza et al. 1999).

Após o surgimento das pupas, os potes foram recobertos por tecido náilon com um pequeno orifício central, por meio do qual os insetos adultos, ao nascerem, foram retirados com auxílio do tubo capturador de Castro e transferidos para as gaiolas de tecido náilon.

Os flebótomos originários de Jacobina foram mantidos em temperatura ambiente de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $86 \pm 10\%$ . Os insetos foram conservados na ausência de luminosidade, dentro de armários de aço, sendo expostos à luz somente quando houvesse necessidade de manipulação dos potes.

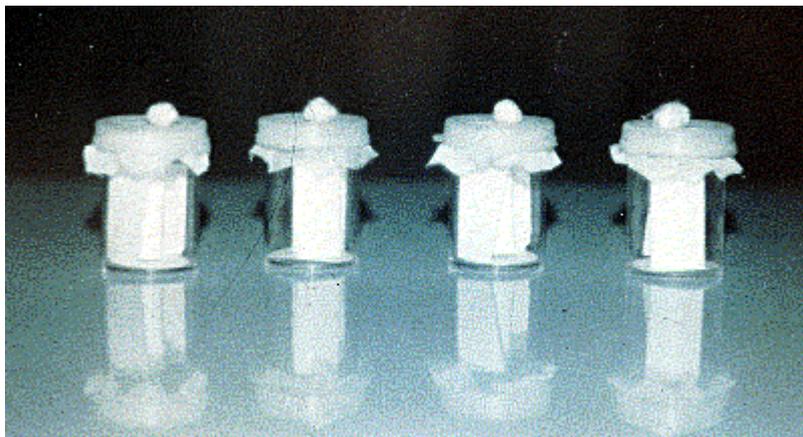


Figura 5 – Tubo de polietileno utilizado para a manutenção das fêmeas de flebotomíneos acondicionadas individualmente.

## **2.2- Espécimes provenientes da Gruta da Lapinha:**

A metodologia de manutenção dos flebótomos oriundos da Gruta da Lapinha foi a proposta por Modi & Tesh (1983) e Wermelinger et al. (1987) com modificações.

Os insetos adultos coletados no campo foram transportados para o laboratório em potes plásticos de polietileno recobertos por tecido náilon, com o fundo revestido por gesso estuque. Esses potes foram mantidos dentro de caixas de isopor que continham uma esponja embebida em água destilada, para manutenção do nível de umidade dentro do isopor, até a chegada ao laboratório.

No laboratório, os flebótomos foram transferidos para gaiolas de tecido náilon, quando, então, foi oferecido um hamster previamente anestesiado com Ketalar, intramuscular 0,2 ml/120 g. Após o período do repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas foram transferidas para novos potes de plástico forrados com gesso, recobertos com tecido de náilon na borda superior. As fêmeas foram mantidas com

solução açucarada em caixas de plástico, no interior das quais foram colocadas esponjas embebidas em água destilada. Posteriormente, essas caixas foram mantidas em estufa BOD, com umidade e temperatura controladas entre  $75 \pm 10 \%$  e  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente, mantidas no Laboratório de Biologia e Controle de Insetos Vetores, do Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz.

A observação dos potes com fêmeas foi realizada em dias alternados, como já assinalado previamente. As fêmeas permaneciam nesse ambiente até que realizassem a postura. Quando as primeiras larvas eclodiam, foi oferecida ração comercial de peixe de aquário Vitormônio®, e a partir de então o seu desenvolvimento foi acompanhado. Os adultos, após emergirem, foram transferidos para novas gaiolas de tecido náilon.

### **3- Obtenção dos antígenos:**

Dois grupos de fêmeas adultas de *L. longipalpis* foram usados como fonte de antígeno. O primeiro grupo consistiu de fêmeas alimentadas exclusivamente com solução açucarada, utilizadas em torno de 48 h após a eclosão. Para obtenção do segundo grupo, fêmeas adultas alimentadas com solução açucarada pelo mesmo período anterior foram submetidas à alimentação sanguínea, na face interna da orelha de coelhos. A dissecação foi realizada por aproximadamente 72 h pós repasto sanguíneo, após o término da digestão do sangue.

A alimentação sanguínea das fêmeas usadas como fonte do 2º grupo foi realizada da seguinte forma: um coelho, não utilizado no esquema de imunizações com extratos, foi acondicionado em caixa de contenção (Nalgene / Rabbit Restrainer and Pyrogen Cage nº 655-0100) (Figura 6). O animal ficava com a cabeça exposta para permitir que as fêmeas realizassem o repasto sanguíneo. Os flebótomos foram então transferidos da gaiola para um recipiente plástico (marca Plastick) (Figura 7), com

fundo forrado por papel filtro umedecido em água destilada, e na borda superior, vedado por tecido náilon. Numa das faces foi feito um orifício maior, para que introduzíssemos o tubo capturador de Castro, por meio do qual os insetos foram transferidos.

Figuras 5 e 6 – Caixa de contenção usada para a exposição dos coelhos às fêmeas de flebotomíneos. (Em destaque recipiente plástico para acondicionar as fêmeas de flebotomíneos).

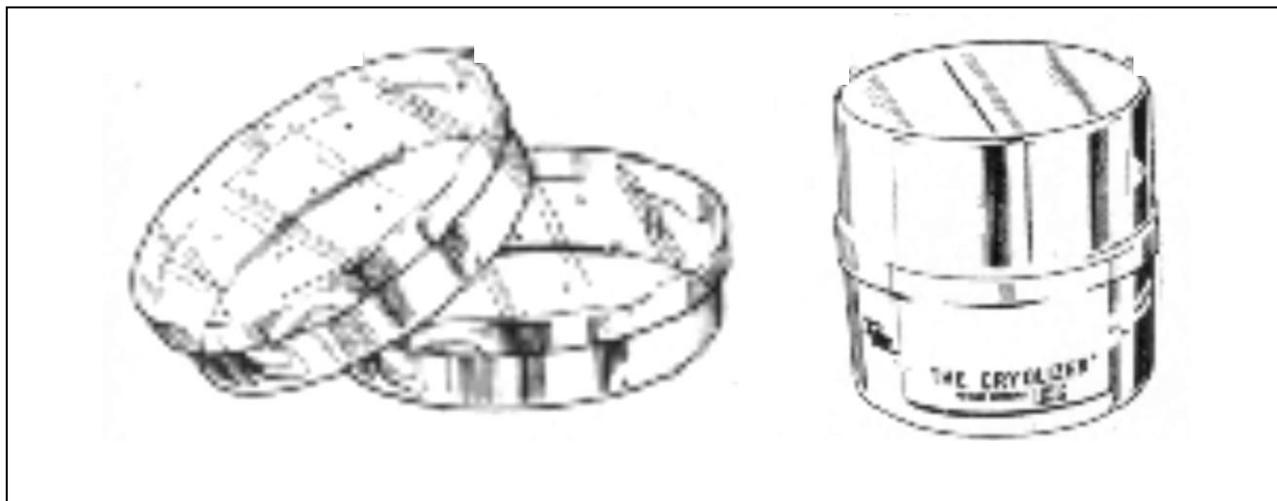
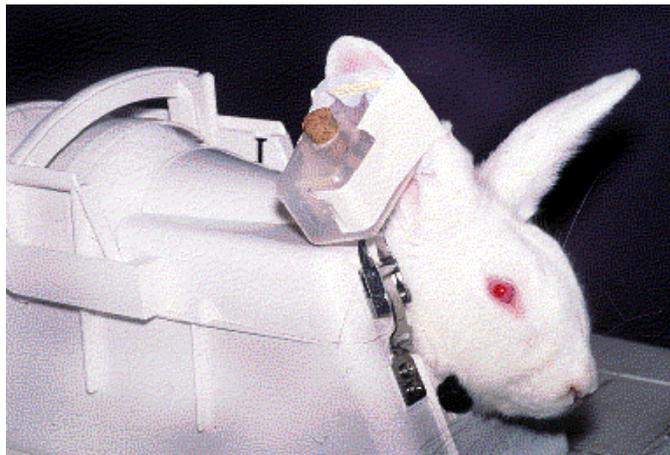


Figura 8 – Placa de polipropileno usada para a manipulação de flebotomíneos a baixa temperatura no período anterior a dissecção.

Entre 50 e 60 fêmeas alimentadas com solução açucarada, por um período mínimo de 48 h, foram colocadas nos recipientes plásticos, como mencionado acima, para realizar o repasto sanguíneo na face interna da orelha do coelho

imobilizado. Esse procedimento foi efetuado diversas vezes, até a obtenção de material necessário para utilização nas imunizações.

Após a alimentação sanguínea, as fêmeas foram colocadas novamente em gaiolas de náilon, acondicionadas como já citado, e recebiam solução açucarada. Permaneciam nas gaiolas até o processo de digestão sanguínea estar concluído, observando se o abdômen da fêmea estava vazio, o que geralmente ocorria aproximadamente em 72 h. A solução açucarada foi trocada em dias intercalados, com a preocupação de evitar a proliferação de fungos.

Para a preparação dos antígenos, cada um dos grupos usados (fêmeas alimentadas exclusivamente com solução açucarada ou fêmeas em final de digestão) foi submetido à dissecação para separação do tubo digestivo e do restante do corpo. Extratos derivados de cada uma destas amostras foram usados separadamente na imunização de coelhos. O procedimento de dissecação está descrito abaixo: as fêmeas foram levadas ao freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , (geralmente em grupo de 10 fêmeas) onde permaneciam por aproximadamente dez minutos. Após esse período, as fêmeas foram colocadas em uma placa de polipropileno com solução salina e repousadas em uma câmara fria (Cryolizer & Growth Chamber) (Figura 8). Em seguida, uma fêmea foi removida de cada vez, com auxílio de um pincel seco, e transferida para uma lâmina de vidro que continha uma gota de solução salina.

As dissecações dos tubos digestivos foram realizadas com uso de estiletes, em lupa estereomicroscópica (marca Carl Zeiss). Na etapa de dissecação, o tubo digestivo e o restante do corpo eram separados; as patas e as asas removidas e descartadas. O material dissecado foi depositado em tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo 100  $\mu\text{l}$  de PBS [8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato dibásico de sódio) + 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato monobásico de potássio) por litro de  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4. Em cada tubo foram colocados 30 tubos digestivos juntos com os tubos de Malpighi, e as 30

carcaças provenientes das disseções das fêmeas de flebotomos, as quais foram designadas de “**corpo total**”.

O material dissecado, quando não utilizado imediatamente, foi estocado em freezer – 20°C.

#### **4- Obtenção do soro pré-imune:**

Antes de iniciar o esquema de imunização, os coelhos foram sangrados através de punção cardíaca e cerca de 5 ml de sangue foram coletados de cada animal. O sangue foi colocado em tubos Corning de 15 ml, onde permaneceu por aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente, para coagulação. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1080 g, por 15 minutos a 4°C, quando então os soros foram aliquotados em tubos Eppendorf e estocados em freezer a – 20°C até o uso.

#### **5- Imunização dos coelhos:**

O material dissecado das fêmeas de flebotomos, oriundo das áreas mencionadas, estocado em tubos Eppendorf, foi triturado por meio de um pistilo, centrifugado rapidamente e nomeado da seguinte forma:

- a- Tubo digestivo de fêmeas de flebotomos alimentadas exclusivamente com solução açucarada (**TDA**).
- b- Corpo total de fêmeas alimentadas exclusivamente com solução açucarada (**CTA**).
- c- Tubo digestivo de fêmeas de flebotomos alimentadas com solução açucarada + sangue de coelho (**TDS**).
- d- Corpo total de fêmeas de flebotomos alimentadas com solução açucarada + sangue de coelho (**CTS**).

O material inoculado em coelhos foi originário da dissecação de flebótomos, e foi equivalente a um total de extratos de 30 flebótomos por inoculação (tubos digestivos ou corpos totais).

Para cada extrato foi utilizado o seguinte procedimento: Os coelhos foram imobilizados em mesa de sangria com a porção ventral voltada para cima. A primeira injeção foi realizada por via subcutânea aplicada na porção ventral do animal em dois sítios de inoculação, sendo usada a emulsão constituída do extrato correspondente mais o adjuvante completo de Freund's (Laboratórios Difco), num volume final de um ml. Duas injeções subsequentes, com o mesmo volume anterior, foram executadas num intervalo de 10 dias entre elas. Nas duas últimas etapas de imunização o adjuvante empregado foi o incompleto de Freund's (Laboratórios Difco). No coelho controle foi inoculada uma preparação de PBS mais o respectivo adjuvante, seguindo o mesmo roteiro utilizado anteriormente.

Para avaliar a influência de anticorpos anti-saliva sobre os parâmetros biológicos de *L. longipalpis*, foi executado um esquema de imunização de coelho através de sucessivas picadas de fêmeas de flebótomos. Esse animal foi denominado de coelho PICADA. Foram colocadas cerca de 100-120 fêmeas de flebotomíneos, num total de 720, para realizar os repastos sanguíneos em coelho destinado exclusivamente para essa finalidade. Três rodadas de alimentação foram efetuadas, com duas exposições por rodada e intervalos de três dias entre as exposições. O intervalo entre as rodadas de alimentação foi de 10 dias, perfazendo um total de 6 exposições de fêmeas realizando o repasto sanguíneo.

Dez dias após a última imunização com extratos de fêmeas de flebótomos e a última exposição à picada de fêmeas de flebótomos, todos os coelhos foram sangrados, através de punção cardíaca, para a obtenção do soro imune. Foi empregada a

mesma metodologia usada para os soros pré-ímunés. Esse material foi inicialmente estocado em freezer a – 20°C, até sua utilização.

#### **6- Alimentação das fêmeas de *L. longipalpis* em coelhos imunizados:**

As fêmeas, alimentadas com solução açucarada por pelo menos 48h, foram colocadas para realizar o repasto sanguíneo nos coelhos imunizados. Para cada animal foram utilizadas cerca de 50 fêmeas.

Depois da alimentação, as fêmeas foram transferidas para uma gaiola de tecido náilon, separadas individualmente em tubos, e mantidas em bandejas de aço inox, como descrito inicialmente. As observações foram realizadas em dias alternados. Nesse período, realizava-se a troca do algodão embebido em solução açucarada, e controlava-se a umidade pela aspersão de algumas gotículas de solução antimicótica para evitar a proliferação de fungos. Após a morte de alguma fêmea, o tubo recebia uma numeração e era separado para verificação de postura dos ovos. Notando-se a presença de ovos, esses foram contados. As observações foram realizadas até a morte de todas as fêmeas em cada lote.

Em virtude dos problemas ocorridos em nosso insetário, como já mencionado anteriormente, além de dificuldades relacionadas com a acomodação dos coelhos, inicialmente foram realizados apenas duas avaliações de fêmeas de flebótomos em coelhos, 9 e 18 dias após a última imunização. Os coelhos foram descartados depois destes esquemas de alimentação.

Quando se conseguiu restabelecer a criação de fêmeas de *L. longipalpis* no insetário, as atividades foram reiniciadas, utilizando para isso outros coelhos, que foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Doze dias após a última imunização desse grupo de coelhos, o 1º lote de fêmeas foi colocado para realizar o repasto sanguíneo. O 2º lote de fêmeas alimentou-se 4 dias

depois e o 3º lote foi alimentado 5 dias depois do 2º lote. Convém frisar que os esquemas de alimentação foram realizados em função da disponibilidade de insetos. O esquema final de avaliação de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados resultou da utilização de 5 lotes, perfazendo um total de 1128 fêmeas de flebótomos. Como já relatado, para efeito de análise, os dados obtidos nos 5 lotes foram agrupados.

## **7- Western blot:**

### **7.1 - Eletroforese:**

Após a dissecação, extratos de 30 fêmeas de *L. longipalpis* (TDS, TDA, CTS e CTA) foram acondicionados em tubos Eppendorf de 1,5 ml em volume de 60 µl de salina tampão-fosfato (PBS). Os extratos foram triturados com auxílio de pistilo, foi acrescentado o tampão de aplicação (40µl) e as amostras foram fervidas por 2 minutos e centrifugadas rapidamente.

A análise dos extratos foi realizada através de SDS-PAGE (eletroforese em géis de poli-acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) utilizando-se géis contendo 10% de acrilamida como descrito por Laemmli (1970). O volume das amostras aplicado ao gel foi de 30 µl para as amostras de tubos digestivos (equivalente a 9 fêmeas) e 15 µl para as amostras de corpo total de fêmeas de *L. longipalpis* (equivalente a 4,5 fêmeas).

### **7.2- Transferência do gel:**

As proteínas contidas no gel foram transferidas para filtro de nitrocelulose (0,45 µm, Schleider & Schuell), a 100 V ( $\cong$  250 mA no início,  $\cong$  300 mA ao final) por aproximadamente 1 hora a 4 °C. Após a transferência, o filtro foi corado com Ponceau-S para verificar se, de fato, havia ocorrido a transferência e para

visualização da migração dos marcadores de peso molecular. O excesso de corante foi retirado através de lavagens sucessivas em água destilada; em seguida, o filtro foi marcado, cortado e identificado com caneta esferográfica.

### **7.3 – Reação com anticorpos:**

Os filtros já cortados foram imersos em solução de bloqueio, contendo leite em pó desnatado a 5% em PBS pH 7,4 em placas de Petri, durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

A incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:500, em solução de leite em pó desnatado a 5% / PBS / Tween 20 a 0,05%, foi realizada durante a noite, à temperatura de 4 °C, sob agitação. No dia seguinte, o material foi submetido a 3 lavagens em PBS em intervalos de 30 minutos, sob agitação.

Em seguida, foi realizada a incubação dos filtros com anticorpo secundário (IgG de carneiro anti-IgG de coelho) conjugado com a fosfatase alcalina (Gibco, BRL), diluído na mesma solução utilizada para o anticorpo primário, por um período de 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação, e procedeu-se à lavagem como já relatado acima.

A revelação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante usando 2 ml de BCIP/NBT (substrato para fosfatase alcalina) (Laboratórios KPL Kirkegaard & Perry).

## **8- ELISA:**

### **8.1- Quantificação de proteínas dos extratos de flebótomos:**

A concentração de proteínas de extratos totais de flebótomos foi medida utilizando o kit da Bio-Rad, de acordo com as instruções do fabricante.

## **8.2- Teste de ELISA:**

O teste de ELISA foi realizado para titular os anti-soros dirigidos contra extratos de flebótomos, com exceção do soro referente ao coelho exposto a sucessivas picadas, que não foi submetido a esta análise.

Os extratos de fêmeas de *L. longipalpis* foram preparados e preservados como já detalhado previamente. Após a preparação, foram aplicados 300 ng de proteína (em 100 µl) de cada extrato por poço em placas de microdiluição. As placas foram recobertas com papel PVC e postas para incubação durante a noite à temperatura de 4°C, para execução do “coat da placa”.

No dia seguinte, o líquido foi desprezado, e os poços foram lavados 3 vezes em PBS. O bloqueio foi então realizado com 200 µl de leite em pó desnatado a 5% em PBS, e incubado por 1 hora. O líquido foi desprezado e adicionou-se os anti-soros primários (oriundos de coelhos imunizados com extratos de flebótomos). Em todos os casos foram feitas diluições entre 1:100 e 1:500 em leite, num volume de 200 µl por poço, e a incubação foi feita durante a noite à 4°C em geladeira.

Posteriormente, o líquido foi removido, e o poço lavado 2 vezes em solução de leite desnatado a 5% em PBS. Acrescentou-se o anticorpo secundário (IgG de carneiro anti-IgG de coelho) conjugado com fosfatase alcalina (Gibco, BRL) na diluição de 1:2500, utilizando-se o mesmo volume usado para o anticorpo primário e procedeu-se à incubação por 2 horas à temperatura ambiente.

A leitura de absorbância foi feita em leitor de ELISA a 405 nm, fabricante Anthos HTLL.

## **9- Análise Estatística:**

Para aferir significância entre os resultados obtidos nas avaliações do parâmetro de fecundidade de fêmeas de *L. longipalpis*, foram utilizados diferentes

parâmetros e testes estatísticos: a Mediana; Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Mann-Whitney.

Inicialmente foi empregada a Mediana, uma vez que o número de ovos postos por fêmeas de flebótomos representavam amostras grandes, de valores extremos e assimétricos, e o emprego da média aritmética não representaria um valor que refletisse de forma real a análise pretendida, tornando-se desta forma inviável seu uso.

A mediana é um valor que separa em dois grupos as observações realizadas num determinado experimento. O método empregado nesta avaliação foi aquele em que se ordena de forma crescente todos os números de ovos postos, e aquele que ocupa a posição central da amostra é o valor da mediana (Sounis, 1985); após o emprego desta análise a comparação entre as amostras foi realizada.

Os dados da postura de fêmeas de *L. longipalpis* foram avaliados conjuntamente através do uso de um teste não paramétrico, o Teste de Kruskal-Wallis, que verifica distorções significativas de normalidade das amostras, e avalia o grau de heterogeneidade entre os valores amostrais. O objetivo foi determinar se várias amostras independentes apresentam diferenças ou variações, ou então, se essas diferenças são atribuídas a outros fatores aleatórios de uma mesma amostra ou grupo.

O outro método de avaliação empregado foi o Teste de Mann-Whitney, também um teste não paramétrico, que realiza comparações entre 2 amostras, sem considerar o tipo de distribuição que apresentam, e permite aferir diferenças entre os grupos analisados, obedecendo a uma determinada constante.

A maioria dos testes não-paramétricos não utilizam as observações realizadas mas sim os seus postos. O posto de uma dada observação é obtido arranjando-se todas as observações, segundo seu tamanho, atribuindo-se à menor

das observações o posto 1, a segunda o posto 2 e assim por diante até a maior das  $n$  observações, que recebe o posto  $n$ . O procedimento admite que não existem observações iguais ou empatadas; caso haja empate entre as observações, utiliza-se a média dos postos ou postos médios (Spiegel, 1984).

Em todos os testes estatísticos usados para a análise da fecundidade das fêmeas de flebótomos foi empregado o programa “SPSS for Windows”, com o nível de significância de 5%.

No que concerne os aspectos relacionados à mortalidade das fêmeas, foram realizadas avaliações através dos seguintes testes: Estimativa de Kaplan-Meier (para a construção de Curvas de Sobrevida) e Teste do Qui-quadrado (ou de Mantel-Haenszel), para realizar comparações entre as curvas de sobrevivência.

O primeiro teste apresenta a possibilidade de se avaliar a sobrevivência dos insetos, agrupando-os dentro de intervalos de tempo, e, conseqüentemente, registrando o número de morte de cada indivíduo dentro de um determinado intervalo, obtendo-se ao final a probabilidade estimada de sobrevivência ( $\Pr(T>t)$ ), que corresponde aos percentuais de sobrevivência propriamente ditos.

Os resultados obtidos com as curvas de sobrevivência foram também comparados através do Teste de Mantel-Haenszel ou do Qui-quadrado. Essa prova consiste basicamente na avaliação de diferenças entre curvas de sobrevivência em um determinado intervalo de tempo, com respeito a certos fatores, tais como: tratamento, idade, sexo, estágio de alguma doença, dentre outros. Cada observação realizada é identificada pelo valor do parâmetro de  $k$ , que é conhecido como “graus de liberdade”, representado pelo símbolo  $\chi^2$ . Por exemplo,  $\chi^2_4$  identifica a probabilidade de distribuição do  $\chi^2$  com 4 graus de liberdade. Por esta razão, se  $t_0$  é o valor observado para o teste estatístico  $T$ , então o nível de significância correspondente é  $\Pr(\chi^2_k \geq t_0)$ , onde  $k = n-1$  (Matthews & Farewell, 1988).

## RESULTADOS

### 1- Análise dos soros:

A capacidade dos anti-soros produzidos de reconhecer antígenos específicos, quando submetidos à reação com extratos contra os quais haviam sido produzidos, foi verificada de 2 formas: ELISA e Western blot. No primeiro teste, procurou-se avaliar, de maneira parcial, se os soros imunes possuíam títulos aumentados quando comparados aos soros pré-imunes correspondentes. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 3, os soros imunes forneceram respostas ligeiramente aumentadas em todos os casos, indicando a presença de anticorpos específicos.

Tabela 3 – ELISA – Análise dos soros de coelhos imunizados com extratos de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, usando como antígeno amostras de extratos de fêmeas de flebótomos alimentadas exclusivamente com açúcar e açúcar + sangue (média de quatro experimentos).

	soros	açúcar		açúcar + sangue	
		1/500	1/100	1/500	1/100
TDS	spi	444	470	466	495
	si	468	527	513	583
TDA	spi	443	471	458	473
	si	520	552	533	566
CTS	spi	467	507	488	506
	si	515	535	538	545
CTA	spi	446	479	470	465
	si	553	587	564	571
CONTROLE		450	459	450	459

spi – soro pré-imune.

si – soro imune.

Nos ensaios de Western blot procurou-se avaliar qualitativamente a presença de anticorpos específicos em cada um dos anti-soros produzidos. Para isto, extratos totais ou de tubo digestivo de fêmeas de *L. longipalpis* (alimentadas exclusivamente com açúcar ou após o repasto sanguíneo) foram submetidos a SDS-PAGE,

transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com cada um dos anti-soros produzidos. Em cada caso foram usados como controles os respectivos soros pré-ímmes. Bandas especificamente reconhecidas pelos soros ímmes foram detectadas em todos os soros (Figura 9 e 10). Os soros ímmes anti-TDA e anti-TDS reconhecem várias bandas específicas nos extratos TDS ou TDA. Bandas equivalentes não foram observadas após reação com os soros pré-ímmes respectivos na maioria dos casos (Figura 9). O soro ímune anti-TDS reconheceu basicamente as mesmas bandas que o soro anti-TDA. Algumas pequenas diferenças qualitativas entre os dois soros foram observadas: 1) o reconhecimento, por anti-TDS, de um polipeptídeo de peso molecular em torno 30 kDa, em extratos TDA (canal 5) mas não em extratos TDS (canal 9). Neste caso porém, vale ressaltar que o soro pré-ímmune foi capaz de reconhecer polipeptídeos de mesmo peso molecular (canal 4), o que compromete qualquer conclusão referente à especificidade de resposta; 2) o reconhecimento, por anti-TDA, de 2 polipeptídeos, também na faixa de 30 kDa, em extratos TDS (canal 7). Estes polipeptídeos, não são reconhecidos por anti-TDS (canal 9) nem pelos soros pré-ímmes (canais 6 e 8). Porém, sua relevância não foi avaliada posteriormente. Os soros ímmes anti-CTA e anti-CTS também resultaram em resposta aumentada frente aos antígenos específicos quando comparados com os soros pré-ímmes (Figura 10). Neste caso, como esperado os antígenos revelados são semelhantes para anti-CTA e anti-CTS, mas diferem substancialmente daqueles antígenos reconhecidos pelo soro anti-TDA e anti-TDS (Figura 9).

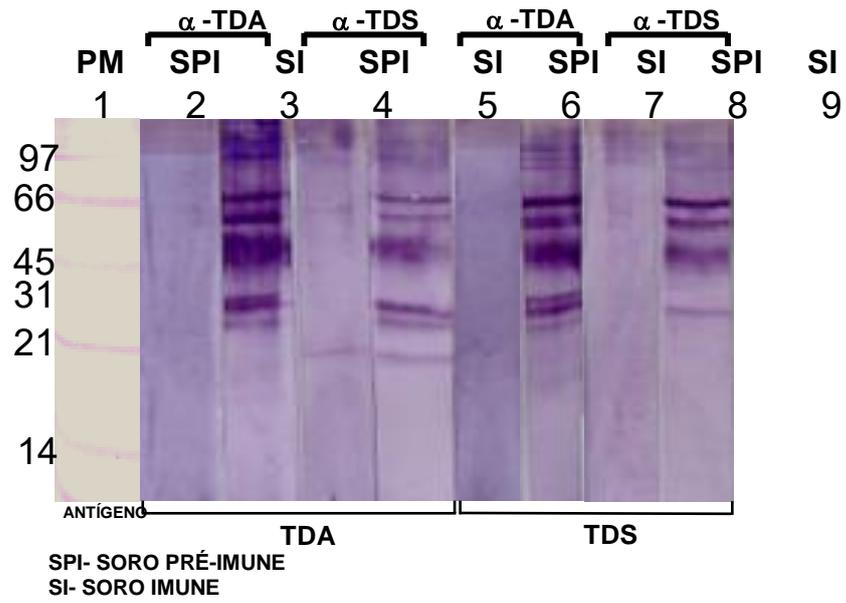


Figura 9 – Western blot de extratos de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*: Reação contra anticorpos  $\alpha$ -TDS e  $\alpha$ -TDA.

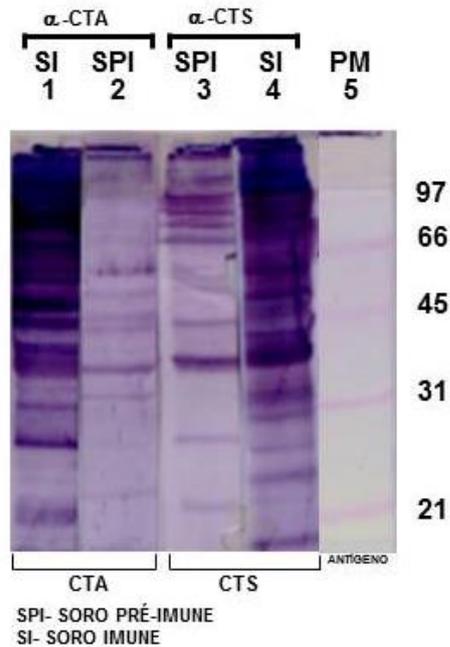


Figura 10 – Western blot de extratos de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*: Reação contra anticorpos  $\alpha$ -CTS e  $\alpha$ -CTA.

## **2- Avaliações dos parâmetros biológicos de fêmeas de *L. longipalpis*:**

### **2.1- Aceitação do repasto sanguíneo:**

Em relação à aceitação do primeiro repasto sanguíneo realizado por fêmeas de *L. longipalpis* em coelhos imunizados com extratos de flebótomos, bem como no coelho exposto a sucessivas picadas, não foram verificadas diferenças entre os grupos avaliados, pois as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo indistintamente.

Para avaliar a quantidade de sangue ingerido fizemos apenas uma inspeção visual. Para pesar os insetos antes e depois do repasto precisaríamos anestesiá-los, o que poderia comprometer sua viabilidade e, conseqüentemente a análise dos parâmetros subsequentes (postura e mortalidade).

Durante o experimento, nenhuma fêmea sobreviveu à postura, conseqüentemente, não foi possível avaliar a aceitação de um segundo repasto sanguíneo.

O período de exposição das fêmeas aos coelhos para realização do repasto sanguíneo apresentou sutis variações entre os grupos de fêmeas alimentadas em coelhos imunizados e controle. Geralmente isso durava cerca de 1-2 horas.

### **2.2- Postura:**

Dois distintos parâmetros devem ser considerados em relação à postura: o número de fêmeas que colocaram ovos e o número de ovos postos por fêmeas. A análise do primeiro parâmetro está descrita simultaneamente à avaliação da mortalidade. Os dados referentes ao número de ovos postos, que foram submetidos a avaliações estatísticas, serão tratados a seguir.

Inicialmente, buscou-se encontrar o valor que representasse o número médio de ovos entre todos os grupos de fêmeas. Empregou-se a Mediana no sentido de corrigir distorções verificadas no número de ovos.

A fonte de alimentação das fêmeas parece ter alguma influência sobre a postura, uma vez que o grupo cujas fêmeas realizaram repasto sanguíneo em coelho imunizado com TDS foi aquele que apresentou o menor valor da Mediana (Figura 11). As fêmeas do grupo CTS, porém, apresentaram um valor próximo. Os grupos TDA e CTA registraram Medianas equivalentes e ligeiramente superiores aos grupos TDS e CTS. Deve-se ressaltar que o grupo PICADA registrou a mesma Mediana que o grupo CONTROLE.

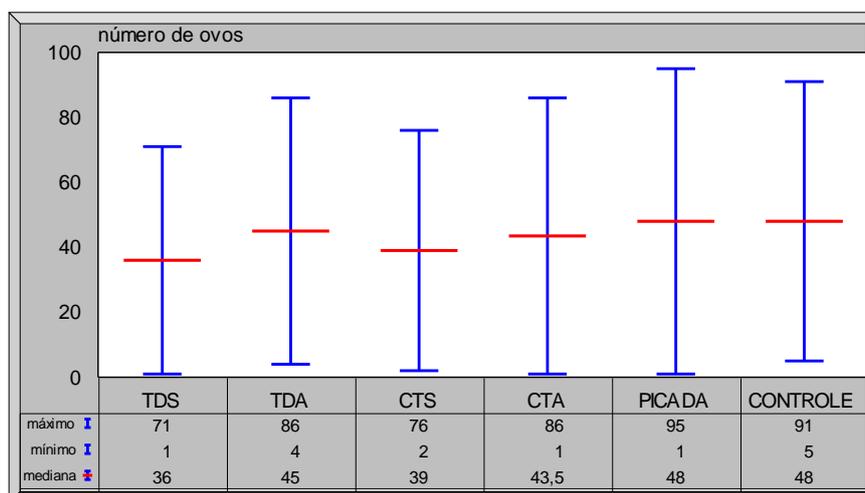


Figura 11 – Números de ovos postos por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas, convertidos para Medianas.

Posteriormente utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis, com o objetivo de analisar conjuntamente os números de ovos postos por fêmeas de *L. longipalpis* de todos os grupos avaliados no estudo. O resultado obtido revelou que o valor estatístico mostrou significância ( $\chi^2 = 33,414$ ;  $p = 0,000$ ), (Tabela 4), isto é, as amostras são diferentes.

Tabela 4 – Análise comparativa do número de ovos postos por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com diferentes extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas, através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis.

Variável	Extratos	n (min.-máx.)	pm	H	p
Número de ovos	TDS	102(1-71)	302,13	33,414	0,000
	TDA	126(4-86)	345,69		
	CTS	98(2-76)	419,18		
	CTA	127(1-86)	365,35		
	PICADA	169(1-95)	348,94		
	CONTROLE	121(5-91)	442,25		

n = número de fêmeas.

pm = posto médio.

p = significância.

Para avaliar de forma mais detalhada as diferenças entre os grupos experimentais, os dados foram submetidos a avaliações através do Teste de Mann-Whitney, que permite realizar comparações entre dados pareados (Tabela 5).

A análise entre os grupos de fêmeas alimentadas em coelho imunizado com TDS e coelho CONTROLE mostrou que o número de ovos postos por fêmeas do primeiro grupo foi menor em relação ao segundo ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ), uma vez que a comparação apresentou expressiva significância estatística, revelando que as amostras apresentavam diferenças.

Comparando os dados dos grupos CTS e CONTROLE, foi observado diferenças entre as amostras ( $p = 0,001$ ;  $p < 0,05$ ), revelando ser estatisticamente significativo, ou seja, as fêmeas do grupo CTS colocaram menos ovos do que as do grupo CONTROLE.

A comparação entre os dados de fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com TDS e TDA demonstrou que no primeiro grupo a redução no número de ovos postos

foi mais evidente do que o observado no segundo, mostrando relevância estatística ( $p = 0,000$ ;  $p < 0,05$ ).

Os dados comparados entre fêmeas alimentadas em coelhos PICADA e CONTROLE, mostrou que as amostras apresentaram diferenças, isto é, as fêmeas do primeiro grupo colocaram menos ovos do que aquelas alimentadas no coelho CONTROLE, e o valor obtido dessa comparação revelou ser estatisticamente significativo ( $p = 0,002$ ;  $p < 0,05$ ). Assim como o visto na comparação entre os dados de fêmeas alimentadas em coelho imunizado com CTA e CONTROLE revelou ter significância estatística ( $p = 0,007$ ;  $p < 0,05$ ).

De maneira contrária, as análises realizadas entre os grupos CTS e CTA ( $p = 0,5192$ ;  $p < 0,05$ ) e entre TDA e CONTROLE ( $p = 0,280$ ;  $p < 0,05$ ), não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 5 – Análise comparativa do número de ovos postos por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com diferentes extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas, através da aplicação do teste de Mann-Whitney.

Variável	Extratos	n (mín.-máx)	pm	p
Número de ovos	TDS	102(1-71)	90,49	0,000
	CONTROLE	121(5-91)	130,13	
	TDA	126(4-86)	119,19	0,280
	CONTROLE	121(5-91)	129,01	
	CTS	98(2-76)	93,85	0,001
	CONTROLE	121(5-91)	123,08	
	CTA	127(1-86)	112,41	0,007
	CONTROLE	121(5-91)	137,19	
	PICADA	169(1-95)	130,22	0,000
	CONTROLE	121(5-91)	166,83	
TDS	102(1-71)	94,60	0,000	
TDA	126(4-86)	130,61		
CTS	98(2-76)	109,82	0,519	
CTA	127(1-86)	115,46		

n = número de fêmeas.

pm = posto médio.

p = significância.

### 2.3- Mortalidade

O acompanhamento da mortalidade das fêmeas de *L. longipalpis* foi realizado simultaneamente à postura dos ovos. Após a morte das fêmeas dentro do tubo, fazia-se o registro do número de fêmeas mortas, da postura e procedia-se à contagem dos ovos.

Os dados relativos à distribuição numérica e ao percentual de mortalidade das fêmeas de *L. longipalpis* avaliadas ao longo do estudo podem ser observados na

Tabela 6 e na Figura 12. O acompanhamento da mortalidade ao longo do tempo, também realizado, está analisado adiante, quando se procurou avaliar separadamente fêmeas sem postura e com postura.

Tabela 6 – Distribuição numérica e percentual de mortalidade de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

Extratos	MSP (n)	MCP (n)	TOTAL (n)	MSP (%)	MCP (%)
TDS	62	110	172	36,0	64,0
TDA	49	123	172	28,5	71,5
CTS	36	103	139	25,9	74,1
CTA	34	145	179	19,0	81,0
PICADA	108	177	285	37,9	62,1
CONTROLE	51	130	181	28,1	71,8

MSP – Mortas Sem Postura    MCP – Mortas Com Postura

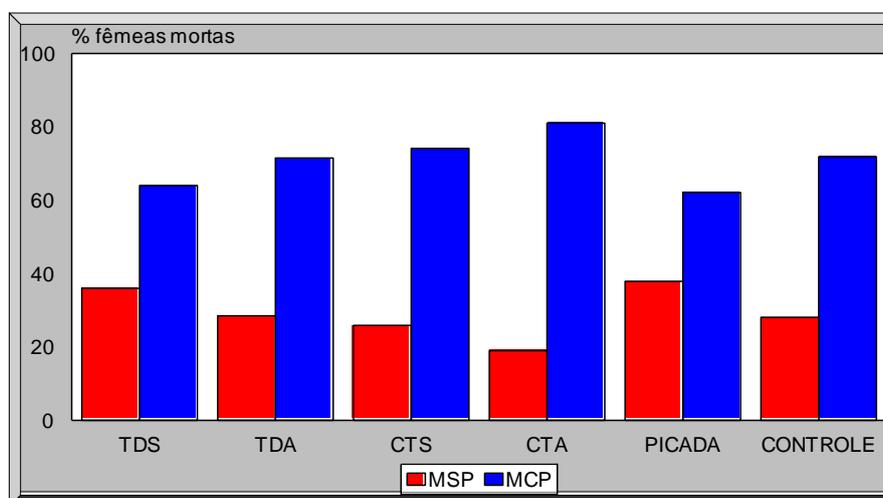


Figura 12- Distribuição percentual da mortalidade de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

### 2.3.1- Fêmeas mortas sem postura (MSP):

Quando o percentual de fêmeas MSP foi analisado em relação ao número total de fêmeas, observou-se que as fêmeas alimentadas no coelho PICADA foram as que apresentaram o mais elevado percentual de morte entre todos os grupos avaliados.

Este percentual, contudo, foi semelhante àquele registrado em fêmeas alimentadas no coelho imunizado com TDS. Cabe ainda ressaltar que os percentuais verificados nos outros grupos não diferiram muito, com exceção daquele observado no grupo de fêmeas alimentadas no coelho imunizado com CTA, que apresentou um percentual menor inclusive em relação ao registrado nas fêmeas do grupo CONTROLE (Tabela 6 e Figura 12).

Os maiores percentuais de mortalidade foram registrados entre o 1° e 5° dias pós-alimentação. As fêmeas pertencentes aos grupos CTS e PICADA foram as que apresentaram os percentuais mais elevados de morte, quando comparadas aos demais grupos (Tabela 7). Os percentuais cumulativos da mortalidade de fêmeas de *L. longipalpis* estão representados na Figura 13.

Tabela 7 – Mortalidade, registrada em dias alternados, de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (MSP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

DIAS	TDS		TDA		CTS		CTA		PICADA		CONTROLE	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	19	30,6	11	22,4	15	41,7	7	20,6	46	42,6	14	27
3	19	30,6	14	28,6	9	25,0	10	29,4	45	41,7	20	39
5	17	27,4	13	26,5	10	27,8	12	35,3	11	10,2	12	24
7	5	8,1	8	16,3	2	5,6	1	2,9	5	4,6	3	6
9	0	0,0	1	2,0	-	-	4	11,8	1	0,9	2	4
11	2	3,2	0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	1	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	1	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	62	100,0	49	100,0	36	100,0	34	100,0	108	100,0	51	100

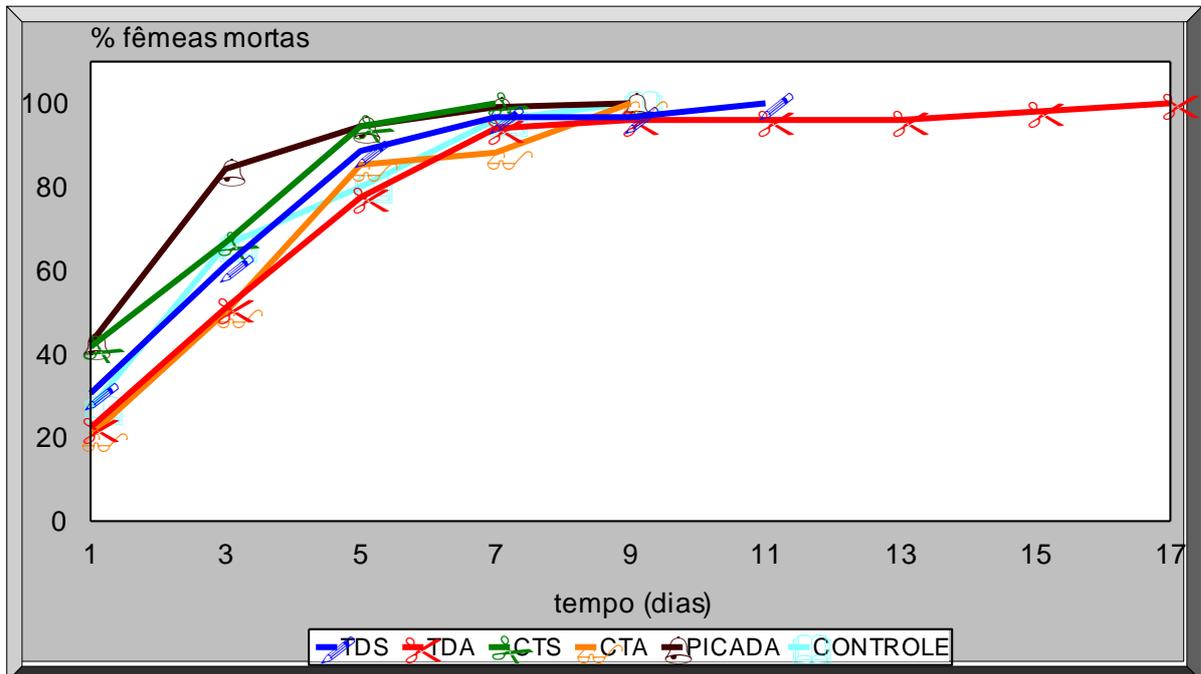


Figura 13- Percentual cumulativo da mortalidade de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (MSP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

### 2.3.2- Fêmeas mortas com postura (MCP):

A análise dos dados relativos à taxa de fêmeas mortas com postura se baseia nos resultados já mostrados na Figura 12.

O grupo que apresentou o menor percentual de fêmeas com postura foi aquele alimentado no coelho exposto a sucessivas picadas (PICADA). Porém, as fêmeas que realizaram repasto sanguíneo em coelho imunizado com TDS mostraram um percentual muito próximo. Por outro lado, o grupo alimentado em coelho imunizado com CTA apresentou o maior percentual de fêmeas com postura (Tabela 6).

Na Tabela 8 está o registro da mortalidade, em dias alternados, de fêmeas de *L. longipalpis* mortas com postura (MCP). Avaliando os percentuais de mortalidade entre fêmeas com postura, registrados entre o 1º e 5º dias, observou-se que as fêmeas alimentadas no coelho PICADA foram as que mostraram o percentual de

morte mais elevado, seguido muito proximamente pelas fêmeas alimentadas no coelho imunizado com CTS. Os percentuais encontrados nos demais grupos mostraram certa similaridade, embora as fêmeas alimentadas no coelho imunizado com TDA tenham apresentado o menor índice de mortalidade. É importante salientar que estes resultados foram equivalentes aos verificados na avaliação de MSP (seção 2.3.1).

Tabela 8 – Mortalidade, registrada em dias alternados, de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (MCP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

DIAS	TDS		TDA		CTS		CTA		PICADA		CONTROLE	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	0	0	7	5,7	1	1,0	5	3,4	5	2,8	3	2,3
<b>3</b>	<b>29</b>	<b>26,4</b>	<b>17</b>	<b>13,8</b>	<b>25</b>	<b>24,3</b>	<b>41</b>	<b>28,3</b>	<b>72</b>	<b>40,7</b>	<b>27</b>	<b>20,8</b>
<b>5</b>	<b>52</b>	<b>47,3</b>	<b>62</b>	<b>50,4</b>	<b>61</b>	<b>59,2</b>	<b>67</b>	<b>46,2</b>	<b>76</b>	<b>42,9</b>	<b>66</b>	<b>50,8</b>
<b>7</b>	<b>21</b>	<b>19,1</b>	<b>24</b>	<b>19,5</b>	<b>15</b>	<b>14,6</b>	<b>27</b>	<b>18,6</b>	<b>18</b>	<b>10,2</b>	<b>24</b>	<b>18,5</b>
9	2	1,8	5	4,1	1	1,0	4	2,8	6	3,4	2	1,5
11	5	4,5	7	5,7	-	-	1	0,7	-	-	5	3,8
13	1	0,9	1	0,8	-	-	-	-	-	-	2	1,5
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,8
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>110</b>	<b>100</b>	<b>123</b>	<b>100,0</b>	<b>103</b>	<b>100</b>	<b>145</b>	<b>100</b>	<b>177</b>	<b>100</b>	<b>130</b>	<b>100,0</b>

Os dados revelam que o período compreendido entre o 3° e 7° dias foi que apresentou os maiores percentuais de mortalidade em todos os grupos de fêmeas (Tabela 8). Na Figura 14 está a representação gráfica dos percentuais cumulativos da mortalidade de fêmeas de *L. longipalpis* que chegaram a realizar a postura (MCP). A Figura 15 registra os percentuais de mortalidade obtidos em dias alternados e evidencia, para a maioria dos grupos experimentais, um pico de mortalidade no 5° dia. A comparação da mortalidade apresentadas nas figuras 14 e 15 mostra que, embora os grupos CTS e PICADA apresentem os maiores índices, no grupo PICADA a mortalidade é antecipada, sendo alta já no 3° dia, o que contribui para a redução do pico no 5° dia.

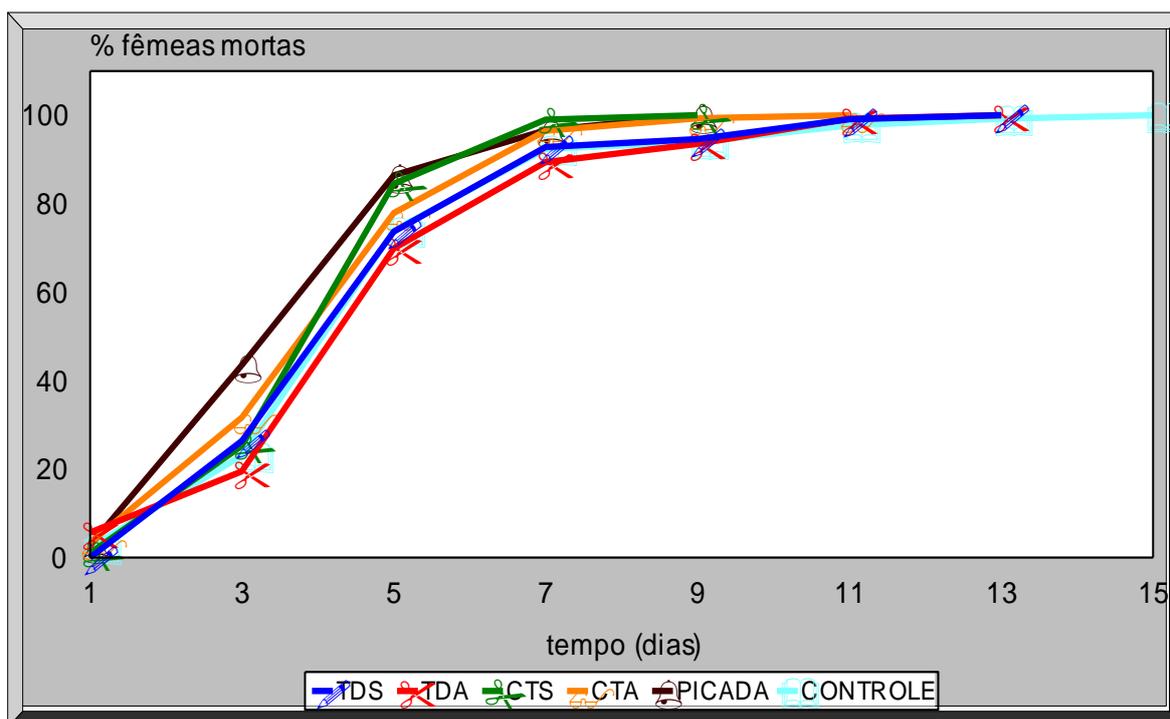


Figura 14- Percentual cumulativo da mortalidade de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (MCP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

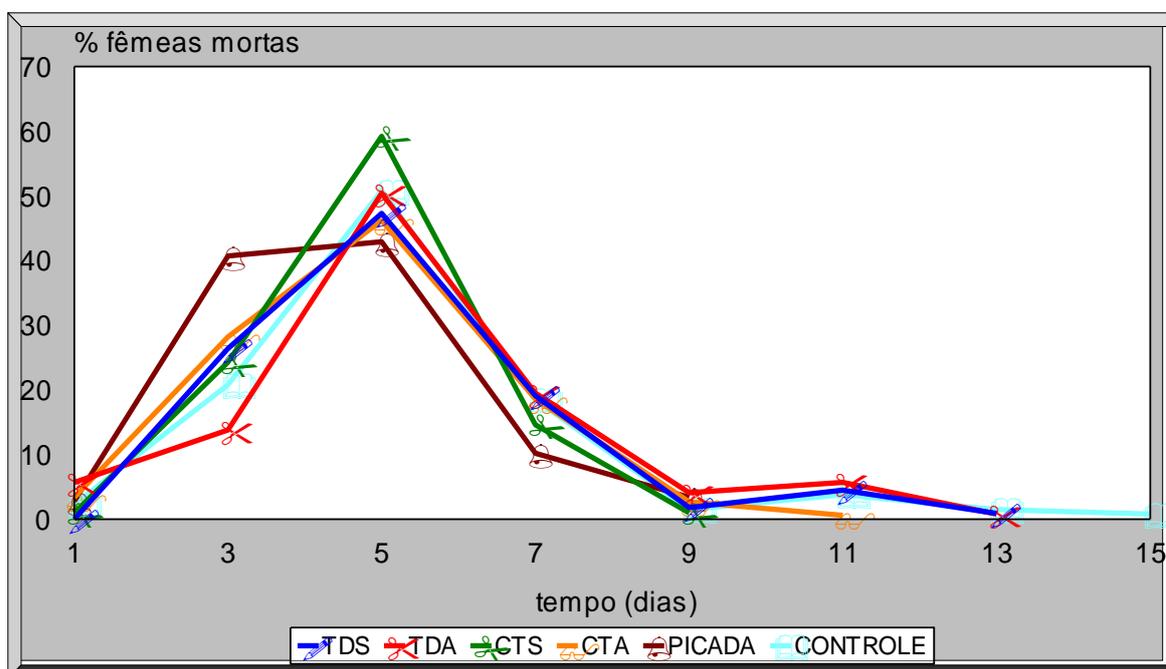


Figura 15- Distribuição percentual da mortalidade de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (MCP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

## 2.4- Longevidade

A análise estatística aplicada à longevidade das fêmeas de *L. longipalpis* avaliadas no decorrer do estudo foi realizada através da construção de curvas de sobrevivência, também denominada Estimativa de Kaplan-Meier. As tabelas referentes à obtenção das curvas de sobrevivência podem ser visualizadas no Anexo.

A representação gráfica das curvas revela que as fêmeas mais longevas foram observadas no grupo TDA, onde a sobrevivência foi verificada até o 15º dia pós-alimentação sanguínea (Figura 16). Entretanto, deve-se ressaltar que esse número não foi representativo, pois apenas uma fêmea (MSP) manteve-se viva até esse dia. Por outro lado, as fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com CTS e PICADA foram as que apresentaram o período de vida mais curto, ou seja, no máximo 7 dias após o repasto sanguíneo.

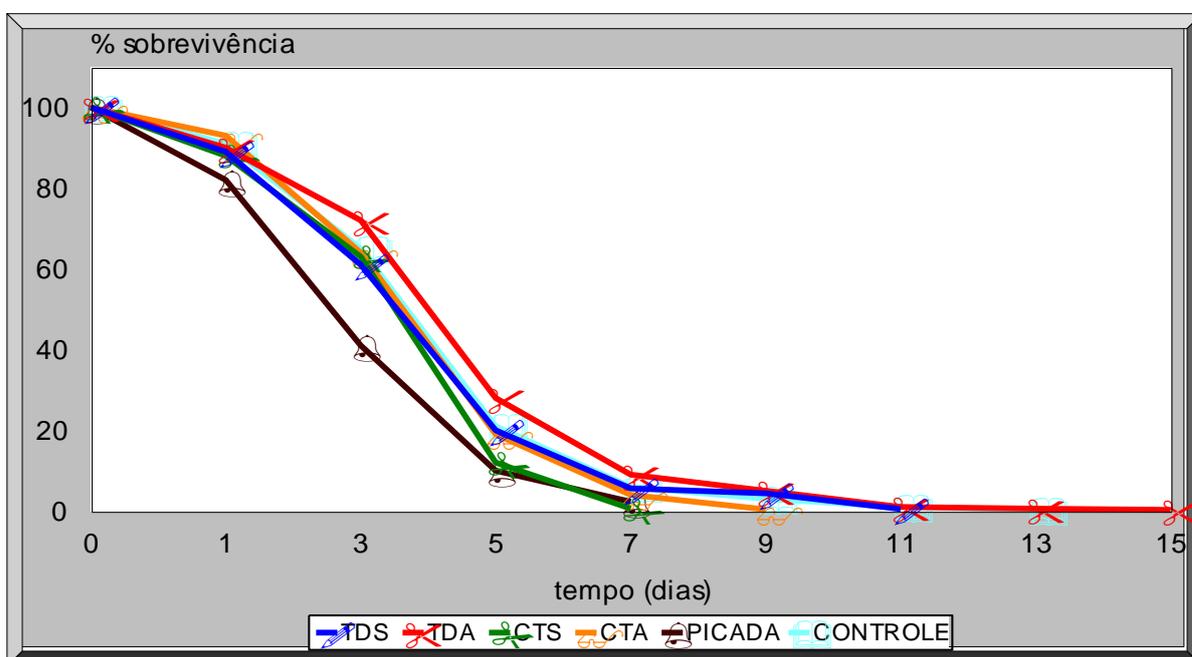


Figura 16- Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebotomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

A análise comparativa das curvas de sobrevivência de fêmeas de *L. longipalpis* foi realizada através do Teste de Mantel-Haenszel. Inicialmente foi realizada a

comparação dos dados gerais de sobrevivência, considerando a longevidade na sua totalidade, sem abordar o aspecto da postura das fêmeas. As tabelas referentes às avaliações entre as curvas de sobrevivência podem ser observadas no Anexo.

A avaliação realizada entre os grupos TDS e CONTROLE, revelou que as curvas de sobrevivência apresentam diferenças e o resultado é estatisticamente significativo ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 0,49)$ ). Assim como a avaliação comparativa entre as curvas de sobrevivência dos grupos TDA e CONTROLE mostrou que o resultado tem significância estatística ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 2,7)$ ). Da mesma forma que a comparação dos dados relativos aos grupos de fêmeas CTA e CONTROLE revelou que as curvas de sobrevivência apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 2,2)$ ). A análise comparativa dos dados de sobrevivência entre os grupos de fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com TDS e TDA, revelou que as curvas de sobrevivência diferem estatisticamente ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 7,7)$ ). Os dados da comparação entre os grupos TDA e CTA mostraram que as curvas de sobrevivência são estatisticamente significantes, revelando diferenças ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 13,3)$ ).

As demais avaliações comparativas não mostraram evidências estatísticas significativas. Deve ser ressaltado que no grupo PICADA não foi detectada significância estatística nas análises realizadas.

A Tabela 9 apresenta os resultados referentes às comparações realizadas entre as curvas de sobrevivência considerando a totalização dos dados (MSP/MCP). No Anexo são apresentadas as tabelas com os dados obtidos das comparações de curvas de sobrevivência entre os diferentes grupos de fêmeas de flebotomos.

Tabela 9- Resultados referentes as comparações realizadas entre as curvas de sobrevivência dos diferentes grupos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos.

	o1	o2	e1	e2	t
TDS x CONTROLE	172	181	164,8	186,9	0,49
TDA x CONTROLE	172	181	192,1	170,3	2,7
CTA x CONTROLE	179	181	164,5	195,0	2,2
TDS x TDA	172	172	146,3	197,1	7,7
TDA x CTA	172	179	205,5	145,1	13,3

**Onde:**

**o1** - número de mortes do grupo 1 registrados em dias.

**o2** - número de mortes do grupo 2 registrados em dias.

**e1** - número esperado de mortes do grupo 1 em dias.

**e2** - número esperado de mortes do grupo 2 em dias.

$$t = \frac{(o1 - e1)^2}{e1} + \frac{(o2 - e2)^2}{e2}$$

**2.4.1- Fêmeas mortas sem postura (MSP):**

Avaliando as curvas de sobrevivência das fêmeas de *L. longipalpis* MSP foi possível observar que o grupo TDA mostrou a maior sobrevida, até o 15º dia pós-repasto. Porém, como já comentado anteriormente, esse número correspondeu a apenas uma fêmea. Aquelas que mostraram ser menos longevas foram as do grupo CTS, uma vez que a sobrevida foi constatada apenas até o 5º dia pós-alimentação (Figura 17). As tabelas referentes à obtenção dos dados das curvas de sobrevivência podem ser observadas em Anexo.

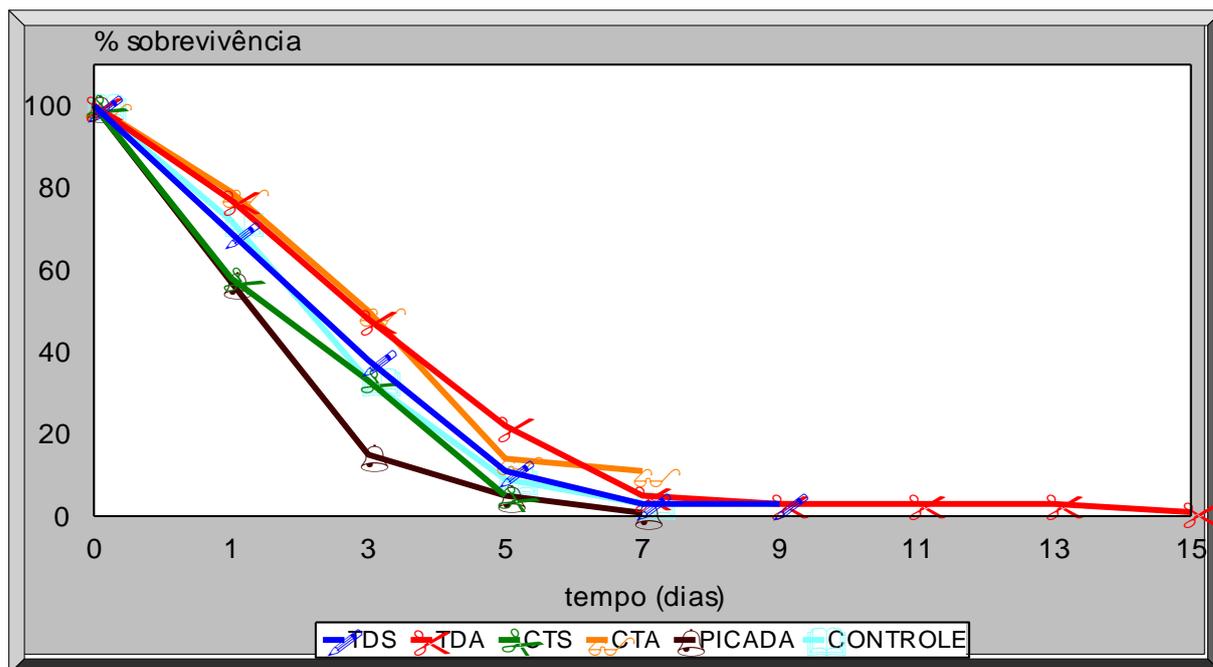


Figura 17 – Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* mortas sem postura (MSP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebotomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

A análise estatística das curvas de sobrevivência entre os grupos TDS e CONTROLE revelou diferenças significativas ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_6 \geq 0,28)$ ). Da mesma forma, os resultados vistos entre os grupos TDA e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 6,09)$ ), CTS e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_5 \geq 2,63)$ ), CTA e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_5 \geq 3,32)$ ), TDS e TDA ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 5,08)$ ), CTS e CTA ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_5 \geq 7,9)$ ) mostraram que as diferenças entre as curvas de sobrevivência são estatisticamente significativas, revelando diferenças entre elas.

Na Tabela 10 são visualizados os dados após às comparações realizadas entre as curvas de sobrevivência de fêmeas de *L. longipalpis* MSP alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebotomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

No Anexo podem ser observados as tabelas com os dados obtidos após às comparações de curvas de sobrevivência de fêmeas de *L. longipalpis* MSP avaliadas no estudo.

Tabela 10- Resultados referentes as comparações realizadas entre as curvas de sobrevivência dos diferentes grupos de fêmeas de *L. longipalpis* MSP alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos.

	o1	o2	e1	e2	T
TDS x CONTROLE	62	51	63,46	47,51	0,28
TDA x CONTROLE	49	51	60,35	38,63	6,09
CTS x CONTROLE	36	51	28,78	56,21	2,63
CTA x CONTROLE	34	51	37,85	40,14	3,32
TDS x TDA	62	49	49,79	60,20	5,08
CTS x CTA	36	34	23,76	42,21	7,9

#### 2.4.2- Fêmeas mortas com postura (MCP):

A análise gráfica das curvas de sobrevivência destes grupos (Figura 18) revelou que as fêmeas CTS e PICADA foram as que apresentaram a menor sobrevida, já que só foram observadas fêmeas vivas até o 7º dia pós-repasto. Neste grupo a maior sobrevida foi observada nas fêmeas do grupo CONTROLE, até o 13º dia pós-alimentação. As tabelas referentes à obtenção das curvas de sobrevivência podem ser observadas no Anexo.

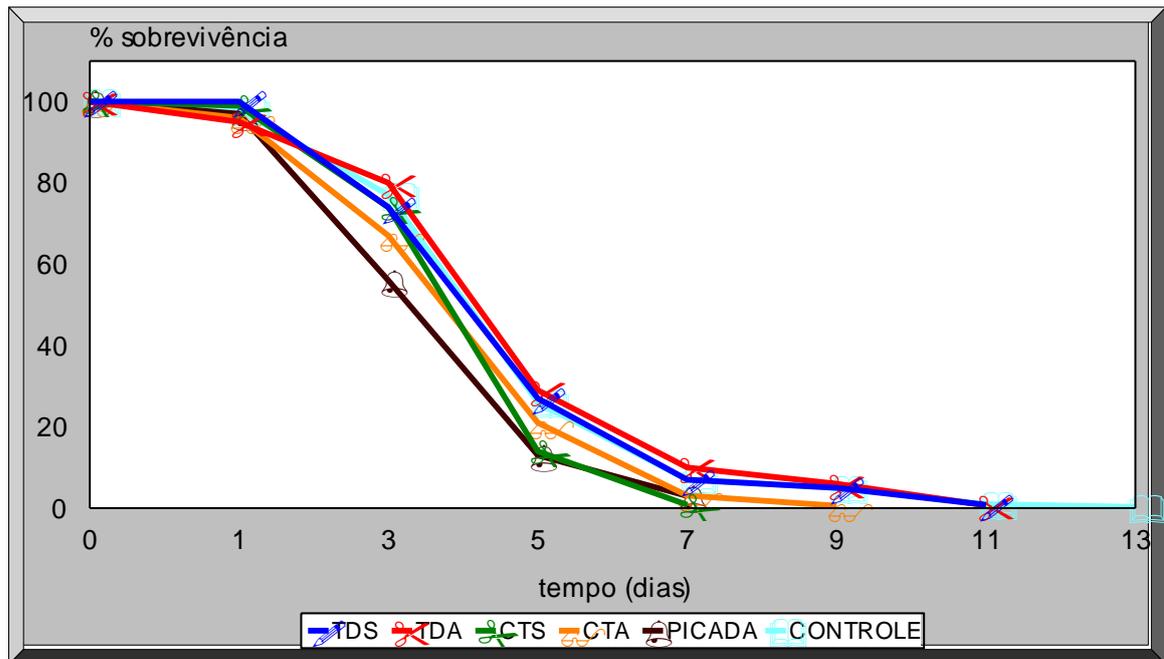


Figura 18 – Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* mortas com postura (MCP) alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebotomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

As comparações das curvas de sobrevivência realizadas entre os grupos TDS e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 0,74)$ ), TDA e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_7 \geq 0,32)$ ), CTA e CONTROLE ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 8,81)$ ), TDS e TDA ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 2,57)$ ) e CTS e CTA ( $t = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 14,77)$ ) revelaram que as curvas de sobrevivência são diferentes, isto é, são estatisticamente significativas.

Na Tabela 11 são observados os resultados referentes às comparações de curvas de sobrevivência de fêmeas de *L. longipalpis* MCP alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebotomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

No Anexo são verificadas as tabelas com os dados obtidos após às comparações de curvas de sobrevivência realizadas entre os diferentes grupos de fêmeas de *L. longipalpis* MCP.

Tabela 11- Resultados referentes as comparações realizadas entre as curvas de sobrevivência dos diferentes grupos de fêmeas de *L. longipalpis* MCP alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos.

	o1	o2	e1	e2	T
TDS x CONTROLE	110	130	102,53	135,39	0,74
TDA x CONTROLE	123	130	126,98	124,98	0,32
CTA x CONTROLE	145	130	120,16	153,82	8,81
TDS x TDA	110	123	95,62	130,34	2,57
CTS x CTA	103	145	73,19	165,92	14,77

## DISCUSSÃO

As doenças transmitidas por artrópodes hematófagos constituem-se num dos grandes desafios com que a humanidade se defronta e que continua a enfrentar ao longo de sua história. Em várias regiões do mundo observa-se o recrudescimento de doenças veiculadas por esses vetores, relegando parcelas expressivas da população a um quadro de agravo social que influencia diretamente na qualidade de vida.

A desigualdade socioeconômica, os distúrbios ambientais frequentes e, em algumas circunstâncias, as políticas públicas equivocadas favorecem de forma preponderante o aumento de indivíduos expostos ao risco de contraírem infecções por microrganismos patógenos, notadamente aquelas em que os artrópodes desempenham papel fundamental na transmissão.

Apesar do avanço tecnológico, os vetores hematófagos têm mostrado mecanismos de adaptação capazes de suplantar as medidas de controle preconizadas. O uso de inseticidas ainda é a medida mais frequentemente utilizada para combater esses artrópodes, mesmo se levando em conta a resistência que alguns deles desenvolveram contra uma gama diversa de compostos químicos. Da mesma forma, os parasitas em contato intrínseco com seus hospedeiros e submetidos a processos de co-evolução, também têm desenvolvido meios de vencer as barreiras impostas pelos mecanismos de defesa de seus hospedeiros. Verifica-se, dessa forma, resistência contra algumas drogas, inclusive aquelas que se julgavam eficazes, como é o caso da cloroquina em relação à malária e do glucantime às leishmanioses. Todo esse impacto representa um ônus socioeconômico muito grande, e que nas últimas décadas tem se agravado.

Por essas razões, o uso de uma metodologia de controle que possa apontar para uma perspectiva que minimize o problema é um objetivo que deve ser almejado constantemente pelos órgãos competentes. A utilização de uma estratégia baseada

na imunização de hospedeiros vertebrados com tecidos derivados de artrópodes, ou através de compostos da saliva, tem como finalidade interferir em aspectos vitais do ciclo biológico desses invertebrados, e pode se configurar em uma alternativa a ser considerada, em adição às políticas já existentes.

Os resultados observados com carrapatos têm revelado que o uso desta estratégia pode se tornar viável. Entretanto, é necessário compreender mais detalhadamente os diversos mecanismos envolvidos. No que tange os estudos realizados com insetos, alguns aspectos devem ser considerados, principalmente em relação às suas particularidades fisiológicas e à multiplicidade de ambientes que ocupam, possibilitando um amplo espectro de inter-relações com microrganismos patógenos.

Por outro lado, tem-se conseguido alguns avanços, como tentativas de se construir mosquitos transgênicos que expressem genes que os tornem refratários a alguns parasitas, abrindo um caminho bastante interessante para controlar mais eficazmente algumas doenças.

A utilização de uma estratégia imunológica dessa natureza para o controle da LVA pode apresentar algumas vantagens em relação às medidas já empregadas, como é o caso do uso de inseticidas que revelam restrições quanto à sua utilização contínua. Outro ponto diz respeito ao tratamento dos pacientes, já que os medicamentos prescritos são constituídos em sua grande maioria por drogas de elevada toxicidade, resultando quase sempre em efeitos colaterais danosos aos pacientes, acompanhados muitas vezes de recaídas. Além do que, registra-se a ocorrência de pessoas que não respondem bem ao tratamento, geralmente realizados por períodos prolongados, trazendo um desconforto muito grande para os indivíduos acometidos. Por outro lado, alguns pontos devem ser levados em conta quando se imagina estabelecer alguma medida de controle da LVA, já que esta

questão apresenta uma complexidade que envolve aspectos relacionados aos flebótomos vetores, assim como aqueles concernentes aos hospedeiros vertebrados.

O estudo em questão avalia, pela primeira vez com flebótomos do Novo Mundo, a influência de anticorpos dirigidos contra diferentes extratos de *L. longipalpis*, sabidamente a espécie mais importante na transmissão da LVA. Acredita-se que os resultados aqui apresentados possam de alguma forma, contribuir para um melhor entendimento e aplicação de uma estratégia de controle que seja mais eficiente, com o intuito de reduzir o número de pessoas acometidas com LVA em extensas áreas do Continente Americano.

Para obtenção dos antígenos, as fêmeas de *L. longipalpis* foram dissecadas após o término do processo digestivo (em torno de 72 horas), período em que as leishmânias se fixam no tubo digestivo. Neste sentido, a imunização com flebótomos neste período poderia revelar resultados interessantes no que concerne seu status bioquímico relacionado com a interação parasito-hospedeiro invertebrado. Além do que, pretendeu-se com este esquema evitar que componentes do sangue pudessem de alguma forma interferir na efetividade dos anticorpos ingeridos.

Sabe-se que poucas contribuições foram realizadas sobre o processo digestivo de flebótomos. Dillon & Lane (1993) avaliaram a atividade de algumas enzimas em fêmeas de *P. papatasi* e *P. langeroni* e observaram que a digestão em ambas as espécies ocorreu de forma favorável num pH 8-9. O pico de atividade de protease foi registrado entre 24-34 horas pós-repasto para a primeira espécie e entre 34-48 horas para segunda. A atividade de endo e exo-protease foi completada em 50 horas para *P. papatasi* e 72 horas para *P. langeroni*. A atividade de tripsina esteve confinada ao lúmen do tubo digestivo e a de aminopeptidases foi associada exclusivamente com a parede do tubo digestivo.

A opção pela imunização de coelhos utilizando extratos derivados de tubo digestivo de fêmeas de *L. longipalpis* foi resultado do interesse em analisar sob este aspecto primeiramente a interação parasito-hospedeiro invertebrado, uma vez que o tubo digestivo é o local onde se estabelece este contato. A observação de efeitos deletérios no inseto, decorrentes de anticorpos produzidos por hospedeiros vertebrados, pode se constituir de grande valor para a compreensão dos diversos aspectos epidemiológicos da leishmaniose.

O uso de antígenos derivados da saliva de fêmeas de *L. longipalpis*, com a manutenção de um coelho submetido a um regime de exposições sucessivas a picadas, teve como objetivo verificar se componentes da saliva podem apresentar efeitos lesivos às fêmeas de flebótomos.

No estudo em questão, os soros dos coelhos imunizados com os diferentes extratos, submetidos ao teste de ELISA, apresentaram títulos aumentados quando comparados aos seus respectivos controles (soros pré-ímmunes). Estes resultados foram confirmados por análises do tipo Western blot, quando foi verificado que todos os anti-soros testados foram capazes de reconhecer antígenos específicos presentes em diferentes extratos de *L. longipalpis*.

Ingonga et al. (1996) também verificaram que os soros de hamsters imunizados com tubo digestivo e corpo total de *P. duboscqi* apresentaram títulos aumentados quando comparados com os controles. Os anticorpos anti-tubo digestivo apresentaram uma melhor resposta humoral entre 2-3 semanas pós-imunização, quando comparados aos de corpo total. Ghosh & Mukhopadhyay (1998), ao expor hamsters a sucessivas picadas de fêmeas de *P. argentipes*, registraram que os soros dos animais apresentaram títulos mais elevados do que os controles. O mesmo, porém, não foi observado com os animais imunizados com carcaças (corpo do inseto sem glândulas salivares). Diversos estudos observaram

que os soros de animais imunizados com extratos e saliva de outros insetos reagiram contra antígenos específicos de tecidos oriundos dos mesmos, através do teste de ELISA (Ramasamy et al. 1988; Hatfield, 1988; Ramasamy & Ramasamy, 1990; Ramasamy et al. 1992; Almeida & Billingsley, 1999), e em pelo menos uma ocasião foi relatada a ocorrência de reação cruzada (Ramasamy et al. 1988).

Estudos acerca da especificidade de soros de animais imunizados com extratos de insetos não são muito frequentes. A capacidade antigênica de tecidos de mosquitos e o desenvolvimento de respostas imunes contra eles são importantes para identificar antígenos e otimizar as condições para seu futuro uso no emprego de medidas de controle através desta estratégia (Almeida & Billingsley, 1999).

Apesar disto, a utilização de uma metodologia de controle de insetos através da imunização de hospedeiros vertebrados já despertava o interesse desde muito tempo, mesmo quando houve uma verdadeira revolução na campanha de combate ao *An. gambiae* Giles (1902) no final da década de 30, quando o controle dos adultos foi realizado através de piretróides e o controle das larvas foi feito com “verde paris” (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Ainda assim, os resultados obtidos por Trager (1939<sup>a,b</sup>) trouxeram como consequência a intenção de se realizar estudos com esta abordagem.

Uma das primeiras tentativas de se utilizar insetos para imunizar hospedeiros foi realizada por Dubin et al. (1947) com mosquitos da espécie *An. quadrimaculatus*. Embora, os autores não comentem sobre variações em aspectos relacionados à longevidade ou à fecundidade dos mosquitos, verificou-se neste estudo inibição da aceitação do repasto em coelhos previamente imunizados.

No presente estudo, verificamos que as fêmeas de *L. longipalpis* não apresentaram qualquer variação à aceitação do repasto sanguíneo em coelhos imunizados, uma vez que as fêmeas de flebótomos de todos os grupos avaliados se

alimentaram indistintamente. Neste aspecto, mesmo o repasto realizado por fêmeas do grupo designado PICADA foi equivalente aos demais. Em virtude disso, pode-se sugerir que os anticorpos dirigidos contra extratos do vetor produzidos por coelhos não interferiram de maneira significativa na alimentação de fêmeas de *L. longipalpis*. Os resultados aqui obtidos foram equivalentes àqueles observados em fêmeas de *P. argentipes*, quando não foram registradas diferenças quanto à realização do repasto sanguíneo em hamsters submetidos a repetidas picadas (Ghosh & Mukhopadhyay, 1998). De forma semelhante, Ingonga et al. (1996) verificaram que entre 80-100% das fêmeas de *P. duboscqi* ingurgitaram na primeira exposição a hamsters imunizados com diferentes concentrações de extratos de flebótomos (tubo digestivo e corpo total). Resultados equivalentes foram obtidos por Hatfield (1988) e Ramasamy et al. (1988), com fêmeas de *Ae. aegypti*.

A inconsistência de diferenças observadas entre os grupos experimentais e o grupo CONTROLE pode ser em função do grande intervalo de tempo que os insetos foram mantidos em contato com o hospedeiro vertebrado. Ingonga et al. (1996), não verificaram variações significativas quanto à duração do repasto sanguíneo de fêmeas de *P. duboscqi*, em hamsters, mantiveram os animais em contato por cerca de 2h. Em nosso estudo, as fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas realizaram o repasto num período compreendido entre 1-2 horas. No entanto, foi possível observar discretas diferenças na duração do repasto das fêmeas dos grupos experimentais, quando comparadas com o grupo CONTROLE, onde a alimentação ocorreu num tempo ligeiramente menor.

No tocante ao aspecto da mortalidade, Alger & Cabrera (1972) observaram que fêmeas de *An. stephensi* apresentaram um aumento na mortalidade quando se alimentaram em coelhos imunizados com tubo digestivo de fêmeas alimentadas com

açúcar em relação ao controle. Fêmeas de *An. farauti* também tiveram sua taxa de mortalidade alterada quando realizaram o repasto em camundongos imunizados com tubo digestivo derivado de fêmeas alimentadas com açúcar, quando comparadas com as fêmeas alimentadas em camundongos imunizados com tecidos derivados de fêmeas após o repasto sanguíneo (Ramasamy & Ramasamy, 1990).

Hatfield (1988) verificou que a taxa de mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* apresentou um ligeiro aumento, quando estas se alimentaram em camundongos imunizados com extratos solúveis de tubo digestivo e carcaça. Neste caso, o aumento da mortalidade ocorreu mais precocemente quando os anticorpos apresentaram títulos altos.

A avaliação da mortalidade em nosso estudo considerou o aspecto relacionado com a postura dos ovos (MSP/MCP). No que tange a análise da mortalidade sem postura, deve-se enfatizar que esse aspecto é extremamente relevante do ponto de vista do controle, uma vez a morte das fêmeas anterior à postura dos ovos pode corresponder a um meio de controle da população natural de flebotomíneos. Além disso, caso as fêmeas estejam infectadas, não transmitirão a leishmânia, uma vez que não efetuará o 2º repasto.

A mortalidade das fêmeas anterior à postura dos ovos (MSP) foi mais pronunciada em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelho exposto a sucessivas picadas (PICADA), mas muito próximo ao grupo de fêmeas alimentadas em coelho imunizado com TDS. O período compreendido entre o 1º e 5º dias pós-repasto foi aquele em que a mortalidade foi mais significativa entre todos os grupos avaliados. As fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com CTS/PICADA foram as que registraram a maior mortalidade neste período, tanto em relação às fêmeas MSP (94,5% em ambos os casos), quanto às fêmeas MCP (99% e 89,9%). Após a postura, os maiores percentuais de morte ocorreram entre 3-7

dias. Aqui também as fêmeas dos grupos CTS e PICADA registraram os maiores percentuais de morte, com pico no 5º dia pós-alimentação.

Outros autores também avaliaram a mortalidade em função do tempo decorrido após o repasto, e consideraram separadamente a mortalidade antes e depois da postura.

Ghosh & Mukhopadhyay (1998) relataram que a mortalidade de *P. argentipes*, anterior à postura, aumentou progressivamente entre a primeira e a quinta alimentação em hamsters submetidos a exposições sucessivas de picadas de flebótomos. A análise estatística dos dados, no entanto, não revelou diferenças significativas.

Ingonga et al. (1996) verificaram que a mortalidade de *P. duboscqi*, alimentadas em hamsters imunizados com diferentes concentrações de antígenos (tubo digestivo e corpo total), apresentou um incremento nos 3 primeiros dias de avaliação. O efeito foi mais evidente no grupo de fêmeas alimentadas em hamsters imunizados com tubo digestivo (60 µg/ml), na 1ª alimentação. A mortalidade inicial das fêmeas alimentadas em hamsters imunizados com corpo total do inseto (40 µg/ml) foi mais evidente após a 2ª alimentação.

Neste estudo, quando a sobrevivência das fêmeas de *P. duboscqi* foi acompanhada até seis dias pós-alimentação, observou-se maior mortalidade no grupo alimentado em hamsters imunizados com extratos de tubo digestivo do flebótomo. Em oposição aos dados de Ingonga et al. (1996), no trabalho aqui apresentado, as fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelho imunizado com TDA foram aquelas que apresentaram a maior longevidade entre todos os grupos testados, mesmo considerando-se que apenas uma fêmea sobreviveu até esse dia.

Outros dípteros também apresentaram aumento de mortalidade após ingestão de sangue de animais imunizados com extratos de seus órgãos. Almeida &

Billingsley (1998) observaram menor longevidade de fêmeas de *An. stephensi* após alimentação em camundongos imunizados com tubo digestivo do mesmo mosquito. Por outro lado, a mortalidade apresentou apenas variação transitória quando fêmeas desta espécie eram alimentadas em roedores imunizados com extratos de outros órgãos (cabeça, ovários, e corpo gorduroso).

A mortalidade de moscas *Stomoxys calcitrans* foi alterada após repasto em coelhos imunizados com vários tecidos de moscas da mesma espécie (Schlein & Lewis, 1976). Os autores evidenciaram outros efeitos, tais como: paralisia das pernas, diferenças no depósito de endocutícula e redução do crescimento pós-emergência. Os anti-soros dirigidos contra os músculos torácicos foram aqueles que induziram os maiores efeitos. Entretanto, a especificidade desses anticorpos é discutida, uma vez que a mortalidade de *Glossina morsitans* também aumentou após alimentação nos mesmos coelhos.

Variações no aspecto da postura dos ovos foram também verificadas em fêmeas de *L. longipalpis*, sendo que os grupos TDS e CTS foram aqueles em que o efeito foi mais evidente. Ramasamy et al. (1988) observaram que as fêmeas de *Ae. aegypti* apresentaram redução da taxa de fecundidade, na primeira postura e um decréscimo na geração F1, quando efetuaram o repasto sanguíneo em coelhos imunizados com 3 tipos de antígenos oriundos de fêmeas alimentadas com sangue.(cabeça-tórax, tubo digestivo e abdômen). De forma coincidente, Srikrishnaraj et al. (1993) verificaram redução de 29% da taxa de fecundidade de fêmeas de *An. tessellatus* após alimentação em camundongos imunizados com os mesmos antígenos empregados no estudo anterior.

Como relatado por Ramasamy et al. (1988), a redução no número de ovos postos por *Ae. aegypti* pode ser decorrente de poucos oócitos vitelogênicos produzidos após o repasto, e a presença dos anticorpos pode afetar a viabilidade

dos ovos. Em nosso estudo, talvez os anticorpos anti-flebótomos possam de alguma forma estar influenciando a postura das fêmeas, entretanto, vale ressaltar que o acompanhamento do desenvolvimento do ciclo biológico não foi realizado nas gerações seguintes.

Sutherland & Ewen (1974) verificaram redução na taxa de fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas em cobaias e coelhos imunizados com carcaça deste mosquito quando comparadas ao controle. Por outro lado, o número de ovos postos por fêmeas de *Culex tarsalis* alimentadas nestes mesmos animais não sofreu qualquer alteração, sugerindo que, neste caso, os anticorpos produzidos foram específicos.

Almeida & Billingsley (1998) relataram que variações observadas no número de ovos estão diretamente relacionadas ao tamanho do corpo, das condições nutricionais, e da idade fisiológica do inseto, que, da mesma forma, a fonte e a qualidade do repasto sanguíneo são fatores importantes a serem considerados. Os autores verificaram retardo e redução na postura de ovos de fêmeas de *An. stephensi* alimentadas em camundongos imunizados com corpo gorduroso, não comentam acerca desse evento.

O emprego de uma estratégia imunológica de controle que possa revelar efetividade dos anticorpos anti-flebótomos, deve levar em conta alguns aspectos importantes do ponto de vista fisiológico desses insetos. Um deles diz respeito à formação da matriz peritrófica que é secretada dentro do lúmen aproximadamente 24 horas após a ingestão do sangue (Walters et al. 1993). Os insetos hematófagos de uma maneira geral, após a formação dessa matriz, isolam o sangue ingerido da superfície do epitélio, o que de certa forma pode inibir ou mesmo bloquear a ação dos anticorpos anti-tubo digestivo (Jacobs-Lorena & Lemos, 1995). No laboratório, uma forma de evitar essa situação é adicionar quitinase (que inibe a formação da

matriz peritrófica) e inibidores de tripsina (que bloqueiam sua ação) ao sangue ingerido. Os autores realizaram esse experimento com fêmeas de *Ae. aegypti* e verificaram um decréscimo significativo na produção de ovos, sem registrarem efeitos sobre a mortalidade dos mosquitos. No estudo em questão, há o interesse de se empregar futuramente quitinase ao sangue dos coelhos imunizados, e observar se a eficácia dos anticorpos anti-flebótomos sobre os aspectos vitais do inseto pode ser mais pronunciada.

Deve-se ressaltar que o esquema curto de imunização empregado no presente estudo pode não ter favorecido, quando da exposição das fêmeas de flebótomos à alimentação em coelhos imunizados, a redução da taxa de imunoglobulinas da classe IgM. Em outras palavras, os efeitos aqui observados poderiam ter sido mais evidentes se um esquema longo de imunização houvesse sido executado. Por outro lado, além das questões aqui colocadas em relação a este aspecto, observou-se que alguns autores empregaram esquemas de imunizações e desenhos experimentais que diferiram ao aqui estabelecido (Alger & Cabrera, 1972; Sutherland & Ewen, 1974; Ramasamy et al. 1988; Hatfield, 1988; Ramasamy et al. 1992; Srikrishnaraj et al. 1993 e Almeida & Billingsley, 1998).

Outro ponto a ser comentado é quanto ao tipo de adjuvante empregado. No presente estudo foi utilizado o adjuvante de Freund's frequentemente utilizado neste tipo de experimento. Este adjuvante é oleoso, o que pode dificultar sua inoculação e ocasionar algum tipo de estresse aos animais. Mesmo assim, não foi verificada qualquer dificuldade quanto a esse aspecto, pois todo o procedimento de manuseio dos coelhos usados no estudo foi realizado de forma a minimizar, o quanto possível, qualquer tipo de sofrimento para os animais. Hamedi (1999) preconiza um esquema longo de imunização em coelhos, com a utilização de adjuvante aquoso, realizado através de somente injeções endovenosas, e relata que essas medidas oferecem

um menor estresse aos animais, além do que, não resultaram em queda de qualidade dos anti-soros produzidos. Apesar dessas considerações, não se observou qualquer comentário acerca disso nos estudos realizados anteriormente. Enfatiza-se que o uso do adjuvante de Freund's não acarretou problemas que possam aqui ser discutidos.

A utilização de uma estratégia imunológica de controle perpassa pelo entendimento de vários aspectos, tais como, seleção e purificação de antígenos que possam ser utilizados com este objetivo. Outro ponto a ser destacado é a tentativa de se isolar, caracterizar e clonar genes específicos, que causem efeitos deletérios mais eficazmente em espécies de artrópodes vetores.

É importante observar que, face à carência de estudos utilizando extratos ou componentes da saliva de flebotomíneos, muito necessita ser investigado, e que a estratégia aqui apresentada pode se configurar numa alternativa interessante para o controle das leishmanioses, além de outras doenças veiculadas por artrópodes hematófagos.

## CONCLUSÕES

- 1- Os soros de coelhos imunizados com extratos totais ou de tubo digestivo de fêmeas de flebótomos apresentaram, através do teste de ELISA, leituras ligeiramente aumentadas em relação aos soros controle (pré-ímmunes), indicando a presença de anticorpos específicos;
- 2- Foram reconhecidas, através do método de Western blot, bandas específicas por soros de todos os coelhos imunizados;
- 3- Os diferentes tipos de imunização não provocaram diferenças significativas em relação à aceitação de repasto sanguíneo das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*;
- 4- Fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com extratos de tubo digestivo sangue (TDS) foram as que colocaram menor número de ovos;
- 5- A mortalidade de fêmeas com postura (MCP) apresentou pico no 5º dia após o repasto sanguíneo em praticamente todos os grupos avaliados;
- 6- A mortalidade de fêmeas MCP foi maior nos grupos CTS e PICADA;
- 7- A mortalidade de fêmeas anterior à postura (MSP), quando avaliada até o 5º dia, também foi maior nos grupos CTS e PICADA. Porém, quando todo o período de estudo foi considerado, os grupos PICADA e TDS foram os que apresentaram a maior mortalidade;
- 8- Os resultados obtidos nestes ensaios, apesar de revelarem diferenças apenas sutis, sugerem que anticorpos anti-flebótomos influenciam aspectos da biologia de *L. longipalpis* e, portanto, essa abordagem deve ser mais explorada, avaliando, inclusive, a relação parasito-hospedeiro invertebrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES P. 1987. Reservoirs of visceral leishmaniasis. in *Leishmaniasis the Current Status and New Strategies for control*. D.T. Hart Editor – NATO ASI SERIES. Series A: *Life Sciences* 163: 61-70.
- ADLER S 1964. *Leishmania*. *Adv Parasitol* 2: 35-91.
- ALGER NE, CABRERA EJ 1972. An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. *Journal Medical Entomology*, 65(1): 165-168.
- ALMEIDA APG, BILLINGSLEY PF 1998. Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): effects on mosquito survival and fecundity. *Int J Parasitol* 28: 1721-1731.
- ALMEIDA APG, BILLINGSLEY PF 1999. Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi*: reactivity characteristics of immune sera. *Med Vet Entomol* 13: 53-64.
- ARAGÃO HB 1922. Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brasil Médico* 36: 129-130.
- ARAÚJO FILHO NA 1979. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Ilha Grande. Master Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 144pp.
- ARIAS JR, FREITAS RA 1977. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 1. Preliminary findings. *Acta Amazonica* 7: 293-294.
- ARIAS JR, FREITAS RA 1978. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebótomos selváticos. *Acta Amazonica* 8: 387-396.
- ARIAS JR, MILES MA, NAIFF RD, POVOA MM, FREITAS RA, BIANCARDI CB, CASTELLON EG 1985. Flagellate infections of brazilian sand flies (Diptera:

- Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 34: 1098-1108.
- AZEVEDO ACR 1998. Estudos comparativos de populações de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em diferentes regiões do Brasil. MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rio de Janeiro 120 pp.
- AZEVEDO ACR, RANGEL EF, COSTA EM, DAVID J, VASCONCELOS AW, LOPES VG 1990a. Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) Whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmaniasis* of the complex *braziliensis* in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 251.
- AZEVEDO ACR, RANGEL EF, QUEIROZ RG 1990b. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of Cutaneous Leishmania in Ceará State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 479.
- BARRAUD PJ 1929. A simple method for carriage of living mosquitos over long distances in the tropics. *Ind J Med Res* 17:281-285.
- BADARÓ R 1995. Changing epidemiology of leishmaniasis in Brazil. *Tropical Diseases, Society and the Environment*. Conference Reports. 2: 97-101.
- BILLINGSLEY PF 1994. Approaches to vector control: new and trusted. 2. Molecular targets in the insect midgut. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88: 136-140.
- BROWN AWA 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140.
- CHAGAS E 1936. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*, 50: 221-222.
- CHRISTENSEN HA, ARIAS JR, VASQUEZ AM, FREIRAS RA 1982. Hosts of sand fly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 31: 239-242.

CONSOLI RAGB, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp 156-157.

COSTA CHN, PEREIRA HF, ARAÚJO MA 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saúde Públ* 24(5): 361-372.

COUTINHO JO 1940. Localização de formas em leptomonas possivelmente de *Leishmania braziliensis*, no faringe do *Phlebotomus pessoai* naturalmente infectado. *Ann Fac Med Unv São Paulo* 16: 163-171.

DEANE LM, DEANE MP 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área de calazar no Ceará. *Hospital*, Rio de Janeiro 48: 61-67.

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

DILLON RJ, LANE RP 1999. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in gut of the sandfly vector. *Parasitology* 118: 27-32.

DILLON RJ, LANE RP 1993. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Med Vet Entomol* 7:225-232.

DUBIN IN, REESE JD, SEAMANS LA 1947 Attempt to produce protection against mosquitoes by active immunization. *J Immunology* 58: 293-297.

FORATTINI OP, PATTOLI DBG, RABELLO EX, FERREIRA AO 1972. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Publ* 6: 431-433.

FORATTINI OP, SANTOS MR 1952. Nota sobre infecção natural de *Phlebotomus intermedius* (Lutz & Neiva, 1912) por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. *Arq Hig Saúde Publ* 17: 171-174.

GALATI EAB, NUNES VLB, REGO Jr FA, OSHIRO ET, CHANG MR 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Públ* 31(4): 378-390.

GALIMBERTTI MZ, KATZ G, CAMARGO-NEVES LF, RODAS LAC, CASANOVA C, COSTA AI, ARAUJO MFL, TANIGUCHI HH, BARBOSA JAR, BARBOSA JE, TOLEZANO JE, PINTO PLS 1999. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Brasil Medicina Tropical Suplemento I* : 217.

GHOSH KN, MUKHOPADHYAY J 1998. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Intern Journal Parasitol* 28: 275-281.

GOMES AC 1986. American leishmaniasis epidemiology in Brazil. *Insect Sci Appl* 7: 161-169.

GRIMALDI G, TESH R. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Research*, 6(3): 230-250.

HAMED A, 1999. Estudo das proteases intestino-específicas de um anofelino neotropical através de anticorpos heterólogos. MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

HATFIELD PR 1988. Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. *Medical Veterinary Entomology* 2: 331-338.

HOCH A, RYAN L, VEXENET JA, ROSA AC, BARRETTO AC 1986. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomines in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl):BI 44.

INGONGA P, MBATI PA, ANJILI CO, MUTANI A, WISHITEMI SO, ROBERT LL, GITHURE JI 1996. The effect of immune sera from hamsters immunized with

- sandfly gut and whole body extract antigens on the fecundity and mortality of *Phlebotomus dubosqi* (Diptera: Psychodidae). *Acta Tropica* 60: 269-279.
- JACOBS-LORENA M, LEMOS FJA 1995. Immunological strategies for control of insects disease vectors: A critical assessment. *Parasitol today* 11(4): 144-1147.
- JOHNSON PT, MC CONNELL E, HERTIG M 1963. Natural infections of leptomonad flagellatates in Panamanian *Phlebotomus sandflies*. *Exp Parasit* 14: 107-122.
- JOHNSTON LAY, KEMP DH, PEARSON RD 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adults ticks: effects of induced immunity on tick population. *Int J Parasitol* 16: 27-34.
- KAY BH, KEMP DH 1994. Vaccines against arthropods. *Am J Trop Med Hyg* 50(6) Suppl. :87-96.
- KEMP DH, AGBEDE RIS, JOHNSTON LAY, GOUGH JM 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adults ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int J Parasitol* 16:115-120.
- KEMP DH, PEARSON RD, GOUGH JM, WILLADSEN P 1989. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp Appl Acarol* 7: 43-58.
- KILLICK-KENDRICK P 1990. Phlebotominae vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 1-24.
- LAEMMLI UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAINSON R 1982. *Leishmaniasis*, p.41-103. In J. H. Steele, Handbook, Series in Zoonoses, Parasitic Zoonoses, 1. C. R. C. Press, Boca Raton, Florida.

- LAINSON R, SHAW JJ 1998. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In *Microbiology Infections*. Ed. Topley & Wilson's, 9<sup>th</sup> Edition, Chapter 13 p. 241-266.
- LAINSON R, SHAW JJ 1968. Leishmaniasis in Brazil: I Observations on enzootic rodent leishmaniasis incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 62: 385-395.
- LAINSON R , SHAW JJ, WARD RD, FRAIHA H 1973. Leishmaniasis in Brazil: IX Considerations of the *Leishmania braziliensis* complex: Importance of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in North Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 67: 184-196.
- LAINSON R, WARD RD, SHAW JJ 1976. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 70: 171-172.
- LAINSON R, WARD RD, SHAW JJ 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by the sand fly *Lutzomyia longipalpis* *Nature* 266: 628-630.
- LAINSON R, SHAW JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In *Biology of Kinetoplastida*, 2. W.H.R. Lumsden, DA Evans Eds. P 1-116, Academic Press, London, New York & San Francisco.
- LAINSON R, SHAW JJ, WARD RD, READY PD, NAIFF RD 1979a. Leishmaniasis in Brazil: XIII Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 73: 239-242.
- LAINSON R, SHAW JJ, READY PD, MILLES MA, POVOA M 1981. Leishmaniasis in Brazil: XVI Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis*

- guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 530-536.
- LAINSON R, BRAGA RR, SOUZA AA, POVOA MM, ISHIKAWA EAY, SILVEIRA FT 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *An Parasit Hum Comp* 64: 200-207.
- LAL AA, SCHRIEFER ME, SACCI JB, GOLDMAN IF, LOUIS-WILEMAN V, COLLINS WE, AZAD AF 1994. Inhibition of malaria parasite development in mosquitoes by anti-mosquito-midgut antibodies. *Infection and Immunity*, 67(1): 316-318.
- LE PONT F, DESJEUX P 1985. Leishmaniasis in Bolivia. 1. *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector of visceral leishmaniasis in Los Yungas. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 79: 227-231.
- LOPES JAS 1956. “*Phlebotomus longipalpis*” naturalmente infectado com formas em leptomonas, na cidade de Jacobina, Bahia. *Rev Med Paraná* 25: 57-58.
- LUTZ A, NEIVA A 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 4: 89-91.
- MARTINS AV, FALCÃO AL, SILVA JE 1984. Nota sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938), com a descrição da fêmea (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 67-70.
- MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF 1991. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc. Brasil Med Trop* 30(Supl. I):162-165.
- MATTHEWS DE, FAREWELL VT 1988. Using and understanding medical statistics. 2<sup>nd</sup>, revised edition, Karger.
- MODI GB, TESH RB 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Ent* 20: 568-569.

- MONTEIRO PS LACERDA MM & ARIAS JR 1994. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*27(Suplemento III) 67-72.
- NAIFF RD, FREITAS RA, NAIFF MF, ARIAS JR BARRETT TV, MOMEN H, GRIMALDI G 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86: 317-321.
- NOGGE G, 1978. Aposymbiotic tsetse flies, *Glossina morsitans morsitans*, obtained by feeding on rabbits immunized specifically with symbionts. *J. Insect Physiol* 24: 299-304.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – Divisão de Controle de Doenças Tropicais 1998 Internet <http://www.who.int/emc/disease/leish/leisepidat/html>
- PESSOA SB, COUTINHO JO 1940. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente de *Leishmania braziliensis*. *Rev Biol Hig* 10: 130-142.
- PESSOA SB, PESTANA BR 1940. Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Acta Médica* 5: 106-111.
- PESSOA SB, COUTINHO JO 1941. Infecção natural e experimental dos flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. *O Hospital* 20: 25-35.
- PESSOA SB, BARRETTO MP 1948. Leishmaniose Tegumentar Americana. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. Ministério Educação Saúde.
- PIMENTA PFP, TURCO SJ, McCONVILLE MJ, LAWYER PG, PERKINS PV, SACKS DL 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Sci* 256: 1812-1815.
- PIMENTA PFP, SARAIVA EM, ROWTON R, MODI GB, GARRAWAY LA, BEVERLEY SM, TURCO S, SACKS DL 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is

controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 9155-9159.

QUEIROZ RG, VASCONCELOS IA, VASCONCELOS AW, PESSOA FA, SOUZA RN, DAVID JR 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Ann J Trop Med Hyg* 50: 693-698.

RAMASAMY MS, RAMASAMY R, KAY BH, KIDSON C 1988. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 87-93.

RAMASAMY M, SANDS M, KAY BH, FANNING ID, LAWRENCE GW, RAMASAMY R 1990. Anti-mosquito antibodies reduce the susceptibility of *Aedes aegypti* to arbovirus infection. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 49-55.

RAMASAMY M, RAMASAMY R 1990. Effect of anti-mosquito antibodies on the infectivity of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* to *Anopheles farauti*. *Medical Veterinary Entomology*, 4: 161-166.

RAMASAMY MS, SRIKRISHNARAJ KA, WIKEKOONE S, JESUTHASAN LSB, RAMASAMY R 1992. Host immunity to mosquitoes: Effect of antimosquito antibodies on *Anopheles tessellatus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal Medical Entomology*, 29(6):934-938.

RANGEL EF 1995. Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situations compared to the classical epidemiology in Amazon region. *Tropical Diseases, Society and the Environment*. Conference Reports. 2: 103-110.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*

79: 395-396.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF 1985. Estabelecimento de colônia em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80(2): 219-226.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, BARBOSA AF, ANDRADE CA 1986. Biologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera :Psychodidae) em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 431-438.

RANGEL EF, SOUZA NA, WERMELINGER ED, AZEVEDO ACR, BARBOSA AF, ANDRADE CA 1986. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 395-396.

RANGEL EF, AZEVEDO ACR, ANDRADE CA, SOUZA, WERMELINGER ED 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(1): 39-45.

RANGEL EF, LAINSON R, SOUZA AS, READY P, AZEVEDO ACR 1996. Variation between geographic populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) *sensu lato* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 43-50.

RANGEL EF, RYAN L, BRAZIL RP 1984. Leishmania infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the island of São Luís, Maranhão State, Brazil, *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 79: 383-384.

REY L 1991. Parasitologia 2ª Edição Ed. Guanabara Koogan.

- RYAN L, SILVEIRA FT, LAINSON R, SHAW JJ 1984. Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the Island of Marajó, Pará State, Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 78: 547-548.
- RYAN L, LAINSON R, SHAW JJ 1987a. Leishmaniasis in Brazil. XXIV Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus welcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 81: 353-359.
- RYAN L, VEXENET A, MARSDEM PD, LAINSON R 1990. The importance of rapid diagnoses of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sand fly vector. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84: 786.
- SANTOS SO, ARIAS J, RIBEIRO AA, HOFFMANN MP, FREITAS RA, MALACCO MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317.
- SCHLEIN Y, LEWIS CCT 1976. Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiol Entomol* 1: 55-59.
- SHERLOCK IA, PESSOA SB 1966. Leptomonas infectando naturalmente *Phlebotomus*, em Salvador (Bahia, Brasil). *Res Lat Amer Microbiol Parasit* 8: 47-50.
- SHERLOCK IA, GUITTON N 1969. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Rev Bras Malar* 21: 541-548.
- SILVEIRA FT, SOUZA AA, SHAW JJ, BRAGA RR, ISHIKAWA EAY 1991. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 127-130.

- SOUNIS E 1985. Bioestatística – Princípios fundamentais, metodologia estatística. Aplicação às Ciências Biológicas. 3ª edição Livraria Atheneu – Rio de Janeiro São Paulo pp 110.
- SOUZA A, ISHIKAWA E, BRAGA R, SILVEIRA F, LAINSON R, SHAW J 1996. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. *Trans Roy Soc of Trop Med and Hyg* 90: 112-13.
- SOUZA NA, ANDRADE-COELHO CA, VILELA ML, BARBOSA AF, RANGEL EF 1999. A new larval diet for colonization of Phlebotominae sand flies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(6): 845-847.
- SPIEGEL MR, 1984. Estatística 2ª Edição Mc Graw-Hill.
- SRIKRISHNARAJ KA, RAMASAMY R, RAMASAMY MS 1993. Fecundity of *Anopheles tessellatus* reduced by the ingestion of murine anti-mosquito antibodies. *Med Vet Entomol* 7:66-68.
- SUDIA WD, CHAMBERLAIN RW 1962. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News* 22: 126-129.
- SUTHERLAND GB, EWEN AB 1974. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. *J Insect Physiol* 20: 655-660.
- TEIXEIRA MG, PENNA GO, RISI JB, PENNA ML, ALVIM MF, MORAES JC, LUNA E 1998. Seleção das doenças de notificação compulsória: Critérios e recomendações para as três esferas de governo. *Informe Epidemiológico do SUS*, VII (1): 7-28.
- TOLEZANO JE, LUVIZOTTO MCR, ULIANA SRB, ARAÚJO MFL, TANIGUCHI HH, BARBOSA JAR, BARBOSA JER, PINTO PLS, FLOETER-WINTER LM, SHAW JS 1999. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigação laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma

- doença emergente em terras paulistas. *Rev Soc Brasil Medicina Tropical* Suplemento I :218.
- TORO-ORTIZ RD, VAZ JR IS, GONZALES, MASUDA A 1997. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet Parasitol* 69: 297-306.
- TRAGER W 1939<sup>a</sup>. Acquired immunity to ticks. *Journal Parasitology*, 25: 57-81
- TRAGER W 1939<sup>b</sup> Further observations on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* Say *Journal Parasitology* 25: 137-139.
- TRAVI BL, VÉLEZ ID, BRUTUS L, SEGURA I, JARAMILLO C, MONTOYA J 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84: 676-677.
- VAZ JR IS, OSAKI LS, MASUDA A 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different ticks tissues. *Vet Parasitol* 52(1-2):71-78.
- VAZ JR IS, MARTINEZ RHM, OLIVEIRA A, HECK A, LOGULLO C, GONZALES JC DEWES H, MASUDA A 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol* 62: 155-160.
- VAZ JR IS, LOGULLO C, SORGINE M, VELLOSO FF, LIMA MFR, GONZALES JC, MASUDA H, OLIVEIRA PL, MASUDA A 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Parasitol* 66: 331-341.
- VIEIRA JBF, COELHO GE 1998. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. Atlas da Epidemiologia e do Controle de Doenças Endêmicas no Brasil *Rev Soc Brasil Med Tropical* 31(Suplemento II):85-92.
- WALTERS LL 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Euk Microbiol* 40: 196-206.

- WALTERS LL, IRONS KP, CHAPLIN G, TESH RB 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 30: 699-718.
- WALTERS LL, IRONS KP, MODI GB, TESH RB 1992. Refractory barriers in the sand fly, *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 46: 211-228.
- WALTERS LL, MODI GB, CHAPLIN GL, TESH RB 1989. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 41(3): 295-317.
- WALTERS LL, MODI GB, TESH RB, BURRAGE T 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonenci* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 36: 294-314.
- WARD RD, LAINSON R, SHAW JJ 1978. Some methods for membrane feeding of laboratory reared neotropical sandflies (Diptera, Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 269-276.
- WERMELINGER ED, RANGEL EF, SOUZA NA, BARBOSA AF 1987. A practical method for mass breeding of sandflies in the laboratory: *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82(3): 441-442.
- WIKEL SK 1982. Immune responses to arthropods and their products. *Ann Rev Entomol* 27: 21-48.
- YOUNG DC, DUNCAN NA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem An Ent Inst* 54: 1-881.

## ANEXO

Curvas de sobrevivência (Estimativa de Kaplan-Meier) de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados e em coelho exposto a sucessivas picadas.

### Mortalidade Total

#### TDS

t	r	n	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	172	1,0	1,0	-
1	19	153	0,89	0,89	0,022
3	48	105	0,69	0,61	0,030
5	69	36	0,34	0,20	0,017
7	26	10	0,28	0,056	0,009
9	2	8	0,80	0,044	0,001
11	7	1	0,12	0,005	0,001
13	1	0	0	0	-

#### TDA

t	r	N	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	172	1,0	1,0	-
1	18	154	0,90	0,90	0,028
3	31	123	0,80	0,72	0,038
5	75	48	0,39	0,28	0,023
7	32	16	0,33	0,09	0,085
9	6	10	0,62	0,05	0,048
11	7	3	0,30	0,01	0,0031
13	1	2	0,66	0,0066	0,0037
15	1	1	0,50	0,0033	0,0023
17	1	0	0	0	-

#### CTS

t	r	n	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	139	1,0	1,0	-
1	16	123	0,88	0,88	0,027
3	34	89	0,72	0,63	0,040
5	71	18	0,20	0,12	0,026
7	17	1	0,05	0,006	0,006
9	1	1	0	0	-

### CTA

t	r	n	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	179	1,0	1,0	-
1	12	167	0,93	0,93	0,019
3	51	116	0,69	0,64	0,035
5	79	37	0,31	0,19	0,028
7	28	9	0,24	0,04	0,013
9	8	1	0,11	0,004	0,003
11	1	0	0	0	-

### PICADA

t	r	n	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	285	1,0	1,0	-
1	51	234	0,82	0,82	0,02
3	117	117	0,50	0,41	0,02
5	87	30	0,26	0,10	0,0087
7	23	7	0,23	0,023	0,0041
9	7	7	0	0	-

### CONTROLE

t	r	n	p <sup>c</sup>	Pr (T>t)	e.p.
0	0	181	1,0	1,0	-
1	17	164	0,91	0,91	0,02
3	47	117	0,71	0,65	0,03
5	78	39	0,33	0,21	0,017
7	27	12	0,31	0,06	0,009
9	4	8	0,66	0,03	0,008
11	5	3	0,38	0,01	0,003
13	2	1	0,33	0,003	0,001
15	1	1	0	0	-

## Fêmeas Mortas Sem Postura (MSP)

### TDS

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	62	1,0	1,0	
1	19	43	0,69	0,69	0,058
3	19	24	0,55	0,38	0,061
5	17	7	0,29	0,11	0,039
7	5	2	0,28	0,03	0,020
9	0	2	1,0	0,03	0,020
11	2	0	0	0	

### TDA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	49	1,0	1,0	
1	11	38	0,77	0,77	0,059
3	14	24	0,63	0,48	0,070
5	13	11	0,45	0,22	0,058
7	8	3	0,27	0,05	0,028
9	1	2	0,67	0,03	0,020
11	0	2	1,0	0,03	0,020
13	0	2	1,0	0,03	0,020
15	1	1	0,5	0,01	0,009
17	1	0	0	0	

### CTS

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	36	1,0	1,0	
1	15	21	0,58	0,58	0,082
3	9	12	0,57	0,33	0,077
5	10	2	0,16	0,05	0,034
7	2	0	0	0	

### CTA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	34	1,0	1,0	
1	7	27	0,79	0,79	0,069
3	10	17	0,63	0,50	0,085
5	12	5	0,29	0,14	0,058
7	1	4	0,80	0,11	0,051
9	4	0	0	0	

## PICADA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	108	1,0	1,0	
1	46	62	0,57	0,57	0,047
3	45	17	0,27	0,15	0,033
5	11	6	0,35	0,05	0,019
7	5	1	0,16	0,008	0,007
9	1	0	0	0	

## CONTROLE

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	51	1,0	1,0	
1	14	37	0,72	0,72	0,062
3	20	17	0,46	0,33	0,065
5	12	5	0,29	0,09	0,038
7	3	2	0,40	0,03	0,020
9	2	0	0	0	

## Fêmeas Mortas Com Postura (MCP)

### TDS

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	110	1,0	1,0	
1	0	110	1,0	1,0	
3	29	81	0,74	0,74	0,041
5	52	29	0,36	0,27	0,042
7	21	8	0,27	0,07	0,023
9	2	6	0,75	0,05	0,019
11	5	1	0,17	0,008	0,008
13	1	0	0	0	

### TDA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	123	1,0	1,0	
1	7	116	0,95	0,95	0,019
3	17	99	0,85	0,80	0,035
5	62	37	0,37	0,29	0,040
7	24	13	0,35	0,10	0,026
9	5	8	0,61	0,06	0,020
11	7	1	0,12	0,007	0,006
13	1	0	0	0	

## CTS

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	103	1,0	1,0	
1	1	102	0,99	0,99	0,009
3	25	77	0,75	0,74	0,043
5	61	16	0,20	0,14	0,032
7	15	1	0,06	0,008	0,007
9	1	0	0	0	

## CTA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	145	1,0	1,0	
1	5	140	0,96	0,96	0,016
3	41	99	0,70	0,67	0,038
5	67	32	0,32	0,21	0,032
7	27	5	0,15	0,031	0,013
9	4	1	0,20	0,006	0,005
11	1	0	0	0	

## PICADA

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	177	1,0	1,0	
1	5	172	0,97	0,97	0,012
3	72	100	0,58	0,56	0,037
5	76	24	0,24	0,13	0,024
7	18	6	0,25	0,03	0,012
9	6	0	0	0	

## CONTROLE

t	r	n	pc	Pr(T>t)	s.e.
0	0	130	1,0	1,0	
1	3	127	0,98	0,98	0,012
3	27	100	0,79	0,77	0,036
5	66	34	0,34	0,26	0,038
7	24	10	0,29	0,07	0,021
9	2	8	0,80	0,05	0,017
11	5	3	0,37	0,01	0,005
13	2	1	0,33	0,003	0,002
15	1	0	0	0	

### Onde:

t - tempo de sobrevivência observado em dias.

r - número de mortes registradas em dias.

n - número de indivíduos ainda sob observação em dias.

**Pc** - proporção de indivíduos sob observação em dias, i.e.,  $(n-r) / n$

**Pr (T>t)** - probabilidade estimada de sobrevivência.

**s.e.** - erro padrão estimado da probabilidade de sobrevivência.

Comparação de curvas de sobrevivência (teste de Mantel-Haenszel) de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em coelhos imunizados com extratos de flebótomos e em coelho exposto a sucessivas picadas.

$$T = (o1-e1)^2 / e1 + (o2-e2)^2 / e2$$

### Longevidade Total

#### TDS x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	353	172	181	0	0	0	0	0
1	317	153	164	36	19	17	17,3	18,6
3	222	105	117	95	48	47	44,9	50
5	75	36	39	147	69	78	70,5	76,4
7	22	10	12	53	26	27	24,1	28,9
9	16	8	8	6	2	4	3	3
11	4	1	3	12	7	5	3	9
13	2	1	1	3	1	2	1,5	0,5
15	2	1	1	1	-	1	0,5	0,5
-	-	-	-	-	172	181	164,8	186,9

(  $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 0,49)$  )

#### TDA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	353	172	181	0	0	0	0	0
1	218	154	164	35	18	17	24,7	26,3
3	240	123	117	78	31	47	33,9	38
5	87	48	39	153	75	78	84,4	68,5
7	28	16	12	59	32	27	33,7	25,2
9	18	10	8	10	6	4	5,5	4,4
11	6	3	3	12	7	5	6	6
13	3	2	1	3	1	2	1,9	0,9
15	1	1	1	2	1	1	1	1
17	1	1	-	1	1	-	1	-
-	-	-	-	-	172	181	192,1	170,3

(  $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 2,7)$  )

### CTA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	360	179	181	0	0	0	0	0
1	331	167	164	29	12	17	14,6	14,3
3	233	116	117	98	51	47	48,7	49,2
5	76	37	39	157	79	78	76,4	80,5
7	21	9	12	55	28	27	23,5	31,4
9	9	1	8	12	8	4	1,3	10,6
11	3	-	3	6	1	5	-	6
13	1	-	1	2	-	2	-	2
15	1	-	1	1	-	1	-	1
-	-	-	-	-	179	181	164,5	195

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 2,2)$ )

### TDS x TDA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	344	172	172	0	0	0	0	0
1	307	153	154	37	19	18	18,4	18,5
3	228	105	123	79	48	31	36,3	42,6
5	84	36	48	144	69	75	61,7	82,2
7	26	10	16	58	26	32	22,3	35,6
9	18	8	10	8	2	6	3,5	4,4
11	4	1	3	14	7	7	3,5	10,5
13	3	1	2	2	1	1	0,6	1,3
15	1	-	1	1	-	1	-	1
17	1	-	1	1	-	1	-	1
-	-	-	-	-	172	172	146,3	197,1

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 7,7)$ )

### TDA x CTA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	350	172	179	0	0	0	0	0
1	321	154	167	30	18	12	14,3	15,6
3	239	123	116	82	31	51	42,2	39,7
5	85	48	37	154	75	79	86,9	67
7	25	16	9	60	32	28	38,4	21,6
9	11	10	1	14	6	8	12,7	1,2
11	3	3	-	8	7	1	8	-
13	2	2	-	1	1	-	1	-
15	1	1	-	1	1	-	1	-
17	1	1	-	1	1	-	1	-
-	-	-	-	-	172	179	205,5	145,1

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 13,3)$ )

## Fêmeas Mortas Sem Postura (MSP)

### TDS x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	113	62	51	0	0	0	17,73	0
1	80	43	37	33	19	14	22,82	15,26
3	41	24	17	39	19	20	16,91	16,17
5	12	7	5	29	17	12	4,0	12,08
7	4	2	2	8	5	3	2,0	4,0
9	2	2	-	2	0	2	-	-
11	-	-	-	2	2	-	-	-
-	-	-	-	-	62	51	63,46	47,51

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_6 \geq 0,28)$ )

### TDA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	100	49	51	0	0	0	0	0
1	75	38	37	25	11	14	12,67	12,33
3	41	24	17	34	14	20	19,90	14,09
5	16	11	5	25	13	12	17,18	7,81
7	5	3	2	11	8	3	6,6	4,4
9	2	2	-	3	1	2	3,0	-
11	2	2	-	0	0	-	0	-
13	2	2	-	0	0	-	0	-
15	1	1	-	1	1	-	1,0	-
17	-	-	-	1	1	-	-	-
-	-	-	-	-	49	51	60,35	38,63

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_9 \geq 6,09)$ )

### CTS x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	87	36	51	0	0	0	0	0
1	58	21	37	29	15	14	10,5	18,5
3	29	12	17	29	9	20	12,0	17,0
5	7	2	5	22	10	12	6,28	15,71
7	2	-	2	5	2	3	-	5,0
9	2	-	-	2	-	2	-	-
-	-	-	-	-	36	51	28,78	56,21

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_5 \geq 2,63)$ )

### CTA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	85	34	51	0	0	0	0	0
1	64	27	37	21	7	14	8,85	12,14
3	34	17	17	30	10	20	15,0	15,0
5	10	5	5	24	12	12	12,0	12,0
7	8	4	2	4	1	3	2,0	1,0
9	-	-	-	6	4	2	-	-
-	-	-	-	-	34	51	37,85	40,14

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_5 \geq 3,32)$ )

### TDS x TDA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	111	62	49	0	0	0	0	0
1	81	43	38	30	19	11	15,92	14,07
3	48	24	24	33	19	14	16,50	16,50
5	18	7	11	30	17	13	11,67	18,34
7	5	2	3	13	5	8	5,20	7,80
9	4	2	2	1	0	1	0,50	0,50
11	2	-	2	2	2	0	-	2,0
13	1	-	2	0	-	0	-	0
15	-	-	1	1	-	1	-	1,0
17	-	-	-	1	-	1	-	-
-	-	-	-	-	62	49	49,79	60,20

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_{9} \geq 5,08)$ )

### CTS x CTA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	70	36	34	0	0	0	0	0
1	48	21	27	22	15	7	9,62	12,37
3	29	12	17	19	9	10	7,86	11,13
5	7	2	5	22	10	12	6,28	15,71
7	4	-	4	3	2	1	-	3,0
9	-	-	0	4	-	4	-	-
-	-	-	-	-	36	34	23,76	42,21

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_{5} \geq 7,9)$ )

### Fêmeas Mortas Com Postura (MCP)

#### TDS x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	240	110	130	0	0	0	0	0
1	237	110	127	3	0	3	1,39	1,6
3	181	81	100	27	0	27	12,08	14,91
5	63	29	34	95	29	66	43,73	51,26
7	18	8	10	76	52	24	33,78	42,23
9	14	6	8	23	21	2	9,8	13,14
11	4	1	3	7	2	5	1,75	5,25
13	1	-	1	7	5	2	-	7,0
15	-	-	-	2	1	1	-	-
-	-	-	-	-	110	130	102,53	135,39

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_{8} \geq 0,74)$ )

### TDA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	253	123	130	0	0	0	0	0
1	243	116	127	10	7	3	4,77	5,22
3	199	99	100	44	17	27	21,88	22,11
5	71	37	34	128	62	66	66,70	61,29
7	23	13	10	48	24	24	27,13	20,86
9	16	8	8	7	5	2	3,5	3,5
11	4	1	3	12	7	5	3,0	9,0
13	1	-	1	3	1	2	-	3,0
-	-	-	-	-	123	130	126,98	124,98

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_7 \geq 0,32)$ )

### CTA x CONTROLE

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	275	145	130	0	0	0	0	0
1	267	140	127	8	5	3	4,19	3,80
3	199	99	100	68	41	27	33,82	34,17
5	66	32	34	133	67	66	64,48	68,51
7	15	5	10	51	27	24	17,0	34,0
9	9	1	8	6	4	2	0,67	5,34
11	3	-	3	6	1	5	-	6,0
13	1	-	1	2	-	2	-	2,0
15	-	-	-	1	-	1	-	-
-	-	-	-	-	145	130	120,16	153,82

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 8,81)$ )

### TDS x TDA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	233	110	123	0	0	0	0	0
1	226	110	116	7	0	7	3,40	3,59
3	180	81	99	17	0	17	7,65	9,35
5	66	29	37	91	29	62	39,98	51,01
7	21	8	13	76	52	24	28,95	47,04
9	14	6	8	26	21	5	11,14	14,85
11	2	1	1	9	2	7	4,5	4,5
13	-	-	-	6	5	1	-	-
15	-	-	-	1	1	-	-	-
-	-	-	-	-	110	123	95,62	130,34

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 2,57)$ )

### CTS x CTA

t	n	n1	n2	r	o1	o2	e1	e2
0	248	103	145	0	0	0	0	0
1	242	102	140	6	1	5	2,52	3,47
3	176	77	99	66	25	41	21,0	37,12
5	48	16	32	128	61	67	42,67	85,33
7	6	1	5	42	15	27	7,0	35,0
9	1	-	1	5	1	4	-	5,0
11	-	-	-	1	-	1	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
					103	145	73,19	165,92

( $t_0 = 0,05 > \Pr(\chi^2_8 \geq 14,77)$ )

**Onde:**

**t** - tempo do evento em dias.

**n** - número de indivíduos ainda sob observação em dias.

**n1** - número de indivíduos ainda sob observação do grupo 1 em dias.

**n2** - número de indivíduos ainda sob observação do grupo 2 em dias

**r** - número de mortes registradas em dias.

**o1** - número de mortes do grupo 1 registrados em dias.

**o2** - número de mortes do grupo 2 registrados em dias.

**e1** - número esperado de mortes do grupo 1 em dias.

**e2** - número esperado de mortes do grupo 2 em dias.

## **ABREVIATURAS**

BCIP – Bromocloroindolilfosfato.

CDC- Center Diseases Control.

CTA- Corpo Total Açúcar.

CTS- Corpo Total Sangue.

ELISA- Enzyme-liked immunosorbent assay.

FNS- Fundação Nacional de Saúde.

LC- Leishmaniose Cutânea.

LCD- Leishmaniose Cutânea Difusa.

LMC- Leishmaniose Mucocutânea.

LPG- Lipofosfoglicano.

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana.

LVA- Leishmaniose Visceral Americana.

MCP- Mortas Com Postura.

MSP- Mortas Sem Postura.

OMS- Organização Mundial de Saúde.

PBS- Tampão salina fosfatada (“phosphate buffer saline”).

PCLV- Programa de Controle da Leishmaniose Visceral.

PICADA- Coelho submetido a sucessivas picadas de fêmeas de flebótomos.

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio.

SNDC- Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória.

TDA- Tubo Digestivo Açúcar.

TDS- Tubo Digestivo Sangue.

UBV- Ultra Baixo Volume.