

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade
vetorial de *Lutzomyia whitmani* no Maranhão, Brasil

Raquel Silva Fonteles

São Luís
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e
capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* no
Maranhão, Brasil

Raquel Silva Fonteles

Orientadores: Oliver Kuppinger
José Manuel Macário Rebelo

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Biodiversidade e Conservação da
Universidade federal do Maranhão, como parte
dos requisitos para obtenção do grau de mestre
em Biodiversidade e Conservação.

São Luís
2009

Fonteles, Raquel Silva

Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* em condições experimentais no Maranhão, Brasil / Raquel Silva Fonteles. – São Luís, 2009.

69 f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientadores: Oliver Kuppinger

José Manuel Macário Rebêlo

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Biodiversidade e Conservação, 2009.

1. Leishmaniose – Infecção Experimental 2. *Lutzomyia whitmani* 3. Capacidade Vetorial

I. Título

CDU 578.23:616.993.161

Raquel Silva Fonteles

Estudo do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* no Maranhão, Brasil

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em/...../....., considera o candidato

Prof. Dr. Oliver Kuppinger
Orientador

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo
Co-Orientador

Prof. Dr. José Carlos Miranda
Fiocruz

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira
Pereira - UFMA

À Deus, criador de toda vida.

À minha família, pelo apoio
emocional durante toda minha
formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À meu pai Luiz, minha mãe Fátima, minha irmã Lia pelo amor e cuidados dedicados a mim e por sempre me apoiarem incondicionalmente na minha escolha profissional.

Ao meu noivo, pela ajuda nas coletas, pelo carinho, amor e dedicação, por entender meus momentos de ausência e me apoiar em tudo.

Ao Prof. Dr. Oliver Kuppinger, meu orientador, pelos ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo, meu co- orientador, por esses anos de ensinamento, de apoio, de conselhos e de oportunidades, essenciais para minha formação acadêmica.

Aos amigos, Patrícia Castelo Branco Azevêdo, Gabriel Costa Vasconcelos, e Gildevan Nolasco Lopes pelo apoio, ajuda e principalmente pela amizade.

À Ana Lúcia Nogueira dos Reis, pela ajuda e paciência durante todo o Mestrado.

Ao amigo, Jorge, cuja ajuda e ensinamentos, foram fundamentais.

À estagiária e amiga Keliane Lobato, pela ajuda nos trabalhos.

E aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para elaboração desta dissertação.

ÍNDICE

Apresentação	01
Capítulo 1. Análise da capacidade vetorial de <i>Lutzomyia whitmani</i> para <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania brasiliensis</i> em condições experimentais.	02
Abstract	04
Resumo	04
1 Introdução	05
2 Material e Métodos	06
3 Resultados	08
4 Discussão	10
Referências	12
Anexo (Normas da Revista Parasitology)	15
Capítulo 2. Estudo do ciclo de vida e caracterização das formas imaturas de <i>Lutzomyia whitmani</i> criados em condições experimentais no município de São Luís – MA, Brasil.	20
Abstract	22
Resumo	22
1 Introdução	23
2 Material e Métodos	25
3 Resultados	28
4 Discussão	30
Referências	33

Anexo (Normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)	37
Capítulo 3. Preferência alimentar sanguínea de <i>Lutzomyia whitmani</i> em área de transmissão de leishmaniose tegumentar no Maranhão, Brasil.	42
Abstract	44
Resumo	44
1 Introdução	45
2 Material e Métodos	46
3 Resultados	47
4 Discussão	50
Referências	53
Anexo (Normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical)	56
Conclusão Geral	61

I - Apresentação

O presente trabalho relata dados científicos acerca de características do ciclo de vida, fonte alimentar e capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani*, provenientes do município de Axixá, localizado na região norte do Maranhão e possuidor de um dos maiores números de casos de Leishmaniose Tegumentar do Estado.

O relato está dividido em três artigos onde o primeiro trata da determinação experimental da capacidade vetorial de *L. whitmani* para *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* que são espécies de *Leishmanias* causadoras da Leishmaniose Tegumentar. Será enviado a revista *Parasitology* para publicação.

O segundo refere-se à determinação do ciclo de vida e caracterização das formas imaturas de *L. whitmani* e será submetido à apreciação da Revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* para publicação.

O último determinou as fontes alimentares sanguíneas de *L. whitmani* que se constituem prováveis reservatórios de *Leishmania*. Este artigo será enviado a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical para publicação.

CAPITULO I

Análise da capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* para *Leishmania amazonensis* e *Leishmania brasiliensis* em condições experimentais.

Análise da capacidade vetorial de *Lutzomyia whitmani* para *Leishmania amazonensis* e
Leishmania brasiliensis em condições experimentais

R. S. Fonteles G. C. Vasconcelos P. C. B Azevêdo J. L. P. Moraes S. R. F. Pereira F. R.
F. Nascimento J. M. M. Rebêlo e O. Kuppinger

Mestrado em Biodiversidade e Conservação, Departamento de Biologia, Universidade
Federal do Maranhão - UFMA. Av. dos Portugueses, s/n, Campus do Bacanga. CEP
65025-560

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Oliver Kuppinger. Laboratório Genética e Biologia Molecular. Departamento
de Biologia (UFMA). Av. dos Portugueses, s/n, Campus do Bacanga. CEP 65025-560.
Fone: (98) 2109-8543. E-mail: oliver.kuppinger@gmx.de

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a análise da suscetibilidade experimental de *Lutzomyia whitmani* para infecção com *Leishmania brasiliensis* causadora da Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Mucosa e *Leishmania amazonensis* causadora da Leishmaniose Cutânea Difusa. Para isso, uma colônia de *L. whitmani* foi estabelecida com a finalidade de fornecer espécimes livres destes parasitas que foram submetidos à alimentação em camundongos experimentalmente infectados com *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*. A infecção com parasita foi detectada a partir da amplificação por PCR de fragmentos de 120 pb de DNA cinetoplasto do gênero *Leishmania* sp. As taxas de infecção encontradas foram de 65,2% e 47,4% para *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*, respectivamente, sendo, portanto, *L. whitmani* suscetível à infecção experimental por estas espécies de *Leishmania*. A comparação entre as taxas de infecção mostrou diferenças significativas. Assim, concluímos que a alta taxa de infecção desse vetor com *L. brasiliensis* associados à estudos epidemiológicos e entomológicos podem responsabilizá-lo pela transmissão da Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Mucosa. Notavelmente, pela primeira vez foi detectado que este flebotomíneo é suscetível à infecção experimental por *L. amazonensis* podendo ser um vetor para transmissão desse patógeno e dispersor da Leishmaniose Cutânea Difusa.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar, *Lutzomyia whitmani*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania amazonensis*, capacidade vetorial

ABSTRACT

In this study we examined, whether *L. whitmani* is susceptible to experimental infection by *L. brasiliensis*, causing Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis, and *L. amazonensis*, causing Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *L. whitmani* individuals were collected to establish a colony free from these parasites. Mice were experimentally infected with *L. brasiliensis* or *L. amazonensis* parasites. Female of this *L. whitmani* colony were permitted to feed on mice exhibiting clinical signs of the disease. Phlebotominae infected with parasites were detected by amplifying a *Leishmania* 120 bp specific kinetoplast DNA by means of PCR. The *L. whitmani* infection rate for *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania amazonensis* was 65.2% and 47.4%, respectively and confirmed that the vector is susceptible to experimental *L. brasiliensis* and *L. amazonensis* infection. Comparison of the infection rates revealed statistically significant differences. The high *L. whitmani* infection rate together with epidemiological and entomological studies, verified that *L. whitmani* is responsible for *L. brasiliensis* infection. Remarkably, here we report for the first time that *L. whitmani* is vulnerable to experimental *L. amazonensis* infection and may be a vector of this pathogen and the distributor for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: Tegumentar Leishmaniasis, *Lutzomyia whitmani*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania amazonensis*, vectorial capacity

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença causada por algumas espécies do gênero *Leishmania* que acomete pele e mucosa. Dentre estas, podemos destacar a *Leishmania brasiliensis*, que está entre as espécies já encontradas parasitando o homem e causando-lhe Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Mucosa, tipos de LT e a *Leishmania amazonensis*, causadora da Leishmaniose Cutânea Difusa – LCD, forma anérgica da LT caracterizada pela formação de nódulos múltiplos na pele (Lainson, R. e Shaw, J. J., 1987).

Uma das principais espécies de flebotomíneo incriminada como vetor da Leishmaniose Tegumentar é *Lutzomyia whitmani* (Azevedo, A. C. R. e Rangel, E. F., 1991; Young, D. G. e Duncan, M.A., 1994). A atribuição do papel vetorial às espécies de flebotomíneos tem sido feita, em alguns trabalhos, através da coexistência do possível vetor com casos da doença em humanos ou animais, mas o emprego desta metodologia não é capaz de comprovar a presença do protozoário no inseto (Camargo-Neves *et al.* 2002).

A determinação da infecção natural de fêmeas de flebotomíneo para estabelecer a capacidade vetorial de uma espécie torna-se difícil, pois essas taxas normalmente são muito baixas e de análise complexa (Pereira *et al.* 2004). Assim este trabalho examinou a capacidade vetorial de *L. whitmani* para *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* através de infecção experimental, a fim de determinar a taxa de infecção destes parasitas no interior do hospedeiro invertebrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

As coletas foram realizadas no Município de Axixá (2°50'08'' S e 44°03'14'' W), região norte do Estado do Maranhão, onde inquéritos entomológicos e epidemiológicos realizados previamente revelaram dados preocupantes em relação à ocorrência de LT (Fonteles, 2007). Os locais de coleta foram selecionados em áreas com maior número de casos da doença e características essencialmente rurais.

Os insetos foram capturados com uso de quatro armadilhas luminosas do tipo HP que funcionaram das 18:00 h às 06:00 h, ininterruptamente, uma vez por mês durante 10 meses totalizando um esforço de captura de 480 horas.

Criação de *L. whitmani*

Com as fêmeas e machos destas coletas foi estabelecida uma colônia de *L. whitmani* no Laboratório exposto a uma elevada influência da maritimidade, temperatura média de 28⁰C e umidade de 80%. As fêmeas foram alimentadas com mel e em camundongos e as larvas com ração (fezes de coelho, terra preta vegetal e ração de peixe) até o último estágio larval. Em todos os estágios e estádios larvais, os potes contendo as formas imaturas foram umedecidos com água destilada e controlados quanto à presença de fungos e ácaros (adaptação da metodologia sugerida por Brazil, R.P. e Brazil, B. G., 2003).

Teste de Capacidade Vetorial

Para determinação da capacidade vetorial, 144 e 156 fêmeas de *L. whitmani* foram submetidas a um único repasto de 40 minutos em um camundongo da linhagem BALB/c (anestesiado com Ketamina e Xilasina) previamente infectado com 10⁶

indivíduos de *Leishmania brasiliensis* (BA 788) e 10^6 indivíduos de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125), respectivamente. As fêmeas eram provenientes da primeira geração da colônia, com dois a três dias de idade e, portanto, livres de infecção e a alimentação se deu após surgimento de sintomas clínicos no camundongo que confirmasse sua real infecção pela *Leishmania* inoculada. As cepas de *Leishmania* utilizadas neste experimento foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunoparasitologia da FIOCRUZ, Bahia.

Após sete dias, os indivíduos de *L. whitmani* ingurgitados foram analisados para determinar a taxa de infecção experimental através da PCR.

Extração de DNA e PCR

Para extração do DNA individual, as amostras foram aquecidas por 10 min a 95°C com 20µl de tampão STE (NaCl 0,1 M; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA), maceradas e acrescidas de STE até completar o volume de 50µl. Posteriormente foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 min e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo.

A PCR foi realizada com um volume final de reação de 20 µl, contendo 10 pmol/l do primer sense: (5'GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA3') e 10 pmol/l do primer antisense: (5'(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACCAACCCC3'), 0,2 µmol/l dNTP, 1,5 µmol/l MgCl₂, 1 unidade de Taq DNA polimerase, tampão para PCR 1 x e 4 µl do DNA extraído das amostras de *L. whitmani*. As condições dos ciclos da PCR no termociclador foram as seguintes: 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para controle negativo foi utilizado água e como controle positivo, DNA de *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. As amostras foram consideradas positivas quando houve amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 120 pb.

Testes Estatísticos

Os dados foram analisados pelo teste Qui-Quadrado, com nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Taxa de infecção experimental de *L. whitmani* para *L. brasiliensis*

Das 144 fêmeas de *L. whitmani* provenientes da colônia alimentadas em camundongo infectado com *L. brasiliensis*, 94 apresentaram fragmentos de DNA específicos de Cinetoplasto de *Leishmania* sp. com um comprimento de aproximadamente 120 pb (Fig. 1).

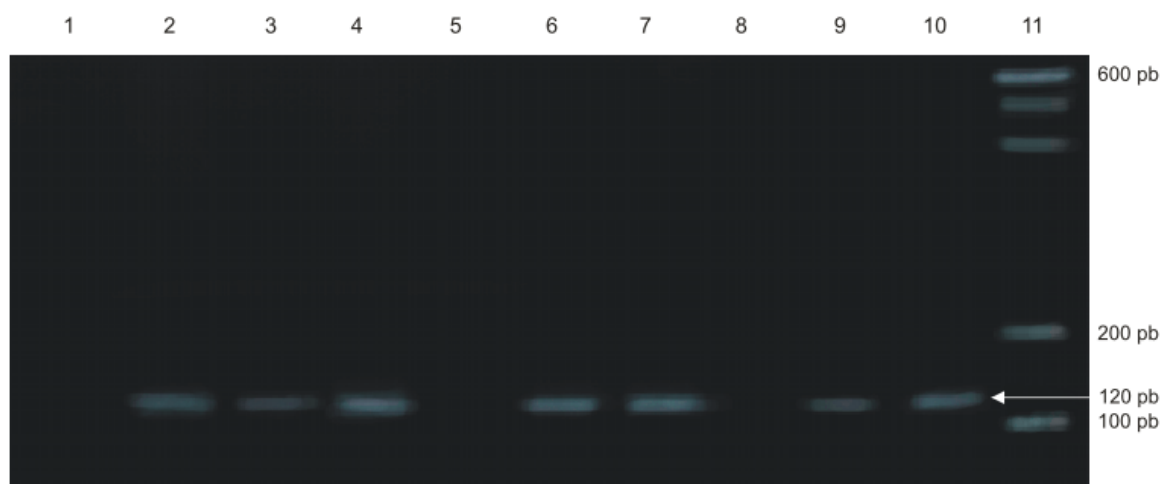


Figura 1. **Determinação da taxa de infecção de *L. whitmani* para *L. brasiliensis*.** Fragmentos de DNA de comprimento de 120 pb amplificado pela PCR para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de flebotomíneos experimentalmente alimentadas com camundongos previamente infectados com *L. brasiliensis*. Linha: 1, controle negativo; 2, 3, 4, 6, 7 e 9 fêmeas de *L. whitmani* infectados com *L.*

brasiliensis (positivas); 5 e 8, fêmeas de *L. whitmani* não infectados (negativas); 10, controle positivo; e 11, marcador de peso molecular (100 pb ladder).

A taxa da infecção experimental encontrada de *L. whitmani* para *L. brasiliensis* foi de 65,2%.

Taxa de infecção experimental de *L. whitmani* para *L. amazonensis*

Para determinação da taxa de infecção em fêmeas de *L. whitmani* provenientes da colônia e submetidas ao repasto em camundongo infectado com *L. amazonensis*, das 156 fêmeas analisadas, 74 apresentaram fragmentos de DNA específicos de Cinetoplasto de *Leishmania* sp. com um comprimento de aproximadamente 120 pb (Fig. 2).

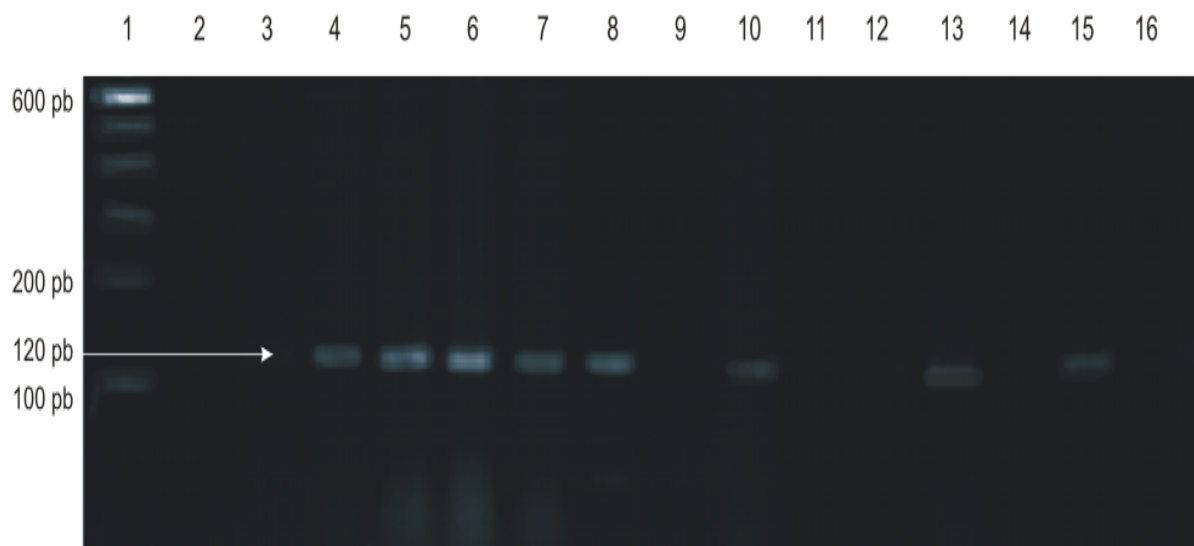


Figura 2. **Determinação da taxa de infecção de *L. whitmani* para *L. amazonensis*.** Fragmentos de DNA de comprimento de 120 pb amplificado pela PCR para o gênero *Leishmania* realizada em fêmeas de *L. whitmani* experimentalmente alimentadas em camundongos previamente infectados com *L. amazonensis*. Linha: 1, marcador de peso molecular; Linha 2, controle negativo; Linhas 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 13 fêmeas de *L. whitmani* infectados com *L. amazonensis* (positivas); 3, 9, 11, 12, 14 e 16, fêmeas de *L. whitmani* não infectados com *L. amazonensis* (negativas); Linha 15, controle positivo.

A taxa da infecção experimental encontrada de *L. whitmani* para *L. amazonensis* foi de 47,4%.

Teste Estatístico

Utilizando o teste do Qui-Quadrado observamos que há diferença significativa ($p = 0,0019$) entre as taxas de infecção detectadas nas duas espécies.

DISCUSSÃO

Entende-se por capacidade vetorial a suscetibilidade que uma determinada espécie tem de adquirir ou se infectar com uma ou mais espécies de parasita. A utilização da PCR na determinação da capacidade vetorial de *L. whitmani* através da taxa de infecção com *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*, como executado neste trabalho, vem esclarecer de forma precisa essa relação vetor-parasita que é de grande importância no controle epidemiológico de doenças infecto-parasitárias como a leishmaniose.

A taxa de infecção experimental de *L. whitmani* com *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* neste estudo foi determinada utilizando indivíduos de *L. whitmani* alimentados experimentalmente em camundongos previamente infectados com estes parasitas, através da PCR, com primers específicos para o gênero *Leishmania*. A confirmação de que a infecção era realmente por estas espécies de *Leishmania* se deu pelo fato das fêmeas utilizadas serem provenientes de uma colônia e terem sido submetidas ao repasto em camundongos experimentalmente infectado somente com *L. brasiliensis* ou somente com *L. amazonensis*.

Em um estudo similar a este, taxas de infecção de *L. longipalpis* submetidos experimentalmente ao repasto em hamster infectado com *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*, utilizando como metodologia a identificação por microscopia a partir da dissecação do trato digestório, foram de 37% e 9% respectivamente (Silva *et al.* 1999).

As maiores taxas de infecção encontradas neste trabalho poder esta diretamente relacionadas à utilização da PCR como método de identificação das *Leishmanias* no interior do inseto em detrimento à microscopia (Aviles *et al.* 1999).

Com os resultados confirmou-se que *L. whitmani* pode se infectar experimentalmente com *L. brasiliensis* e estes dados associados a estudos epidemiológicos e entomológicos podem responsabilizar *L. whitmani* pela transmissão da Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Mucosa, tipos de LT.

Notavelmente, pela primeira vez foi detectado que *L. whitmani* é suscetível à infecção experimental por *L. amazonensis*. O fato desse protozoário, causador da LCD, ter infectado experimentalmente *L. whitmani* levanta a suspeita de que este inseto seja capaz de transmitir *L. amazonensis*. Isso explica a ocorrência de casos de LCD em humanos no município de Buriticupu, na Amazônia maranhense, sem a presença de *L. flaviscutellata* e *L. olmeca*, principais vetores de *L. amazonensis* (Costa, J. M. L. 1998 e Rebêlo *et al.* 2000a, 2000b) e com grande quantidade de *L. whitmani* (Martins *et al.* 2004). Por isso, concluímos que *L. whitmani* pode ser um vetor para transmissão de *L. amazonensis* e dispersor da LCD.

A determinação de que *L. whitmani* é capaz de se infectar experimentalmente com *L. brasiliensis* e a *L. amazonensis*, nos leva a suspeitar que na ausência do vetor específico, uma determinada espécie parasita pode ser transmitida por outro vetor competente que por ventura esteja presente em alta densidade na área. Entretanto, diferenças nas condições dos ambientes natural e laboratorial podem alterar o contexto ecológico na qual *L. whitmani*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* ocorrem, por isso não podemos excluir a possibilidade de *L. whitmani* não se infectar com estes parasitas no ambiente natural.

Assim, pode-se concluir que a determinação de taxas de infecção do vetor é consideravelmente importante para o entendimento da concepção da transmissão e de estudos patogênicos e uma análise profunda das taxas de infecção experimental de *L. whitmani* pode levar a importantes conclusões sobre mudanças na fisiologia do vetor após alimentação sangüínea e infecção parasitária.

Além disso, esses dados podem fornecer subsídios para futuros estudos relacionados à mecanismos de transmissão sob os aspectos moleculares e imunológicos que interferem nessa capacidade vetorial em condições laboratoriais e, portanto ajudar a desenvolver estratégias de prevenção da doença.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelas bolsas de Mestrado concedidas e a FAPEMA pelas bolsas e parcial financiamento do material de consumo do projeto.

REFERÊNCIAS

- Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F. P., Harris, E.** (1999) PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *Parasitology*. **85**, 181-7
- Azevedo, A. C. R., Rangel, E. F.** (1991). A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **86**, 405-410.
- Brazil, R. P., Brazil, B. G.** (2003). Biologia de flebotomíneos neotropicais, p. 257-274. In E.F. Rangel, R. Lainson (org.), 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, FioCruz, **367**.

- Camargo-Neves, V. L. F., Gomes, A. C., Antunes, J. L. F.** (2002). Correlation of the presence of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) with records of American tegumentary leishmaniasis cases in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**.
- Costa, J. M. L.** (1998). Estudo da leishmaniose cutânea difusa Estado do Maranhão, Brasil: avaliação terapêutica e correlação do perfil imunológico entre pacientes e seus familiares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* **31**, 401-403.
- Fonteles, R. S.** (2007). Ecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania* no município de Axixá - Maranhão, Brasil. [Monografia]. Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, **39**.
- Lainson, R., Shaw, J. J.** (1987). Leishmaniasis in Brazil XXIV. Natural flagellate infections of sandfly (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania* (*Leishmania*) *brasilensis* in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **81**, 353-359.
- Martins, L. M., Rebelo, J. M. M., Santos, M. C. F. V., Costa, J. M. L., Silva, A. R., Ferreira, L. A.** (2004). Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad. Saúde Pública.* **20**, 735-743.
- Pereira, Y. N. O., Moraes, J. L. P., Pereira-Martins, S. R., Rebêlo, J. M. M.** (2004). Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* **39**, 540-543
- Rebêlo, J. M. M., Oliveira, S. T., Barros, V. L. L., Silva F. S.** (2000a). Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia maranhense. I -

Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **33**, 11–19.

Rebêlo, J. M. M., Oliveira, S. T., Barros, V. L. L., Silva F. S. (2000b). Flebotomíneos da Amazônia maranhense. IV - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomologia y Vectores*. **7**, 61–72.

Silva, A. L. F. F., Williams, P., Melo, M. N., Mayrink, W. (1999). Susceptibility of laboratory – reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of leishmania Ross, 1903. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **85**, 453-459.

Young, D. G., Duncan, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies; Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Entomology Institute*. **54**, 1-881.

Normas da Revista Parasitology

The manuscript should be organized as follows:

1. TITLE PAGE. The title page should contain (i) a concise and informative full title, (ii) the initials and name(s) of the authors, (iii) the full postal address(es) of the institution(s) where the work was carried out, (iv) a short informative running title and (v) the name and address, telephone, fax and E-mail numbers of the corresponding author. Footnotes containing other addresses may be included. **Nothing else should appear on the title page.**

2. SUMMARY. This should not be more than about 150-200 words, and its purpose is to summarize the main aims, results and conclusions in such a way that they could be understood by any interested reader and not only experts in the subject, and could be used by an abstracting journal. References to published or unpublished work and unnecessary abbreviations should be avoided. Appended to the summary should be 3-10 relevant key words, suitable for indexing. **Nothing else should appear on the summary page.**

3. INTRODUCTION. This should be as short as possible, normally not more than 2-3 paragraphs, and should simply serve to introduce the reader to the purpose and significance of the work described. It should neither be a mini-review nor should it be so bald as to be uninformative. When making general statements, reference should be made to recent reviews, and specific references should be cited only if they are particularly relevant.

4. MATERIALS AND METHODS. Sufficient information for the reader to be able to repeat the work must be given, but techniques described in detail in other publications need not be repeated, provided that an adequate reference is cited. Major modifications to methods should be clearly described. The numbers of experiments, replicates, etc. and any statistical tests used should be stated.

The full binomial name should be given for all organisms, except those such as mice, rats and rabbits, commonly used in laboratories and domesticated animals such as cows, dogs and cats. Generic names should be given in full when first mentioned and

subsequently if any confusion is likely to arise. If reference is made to an uncommon taxon the authority for the taxon and date should be stated. Abbreviations such as *An.* (for *Anopheles*) should be avoided unless absolutely essential, for example when referring to two or more generic names beginning with the same letter. Authors should follow *International Rules for Nomenclature* and, if new names are introduced, the *International Code for Zoological Nomenclature*. All strains and sources of hosts and parasites should be stated.

Abbreviations should be used sparingly and unambiguously. SI units should be used wherever appropriate and other standard statistical, chemical, biochemical and molecular abbreviations may also be used. In case of any doubt, authors are advised to spell out the term in full, followed by the abbreviation in parentheses, when it is first used.

5. RESULTS. These should be confined to a factual account of the actual results obtained. Where necessary results should be analysed using an appropriate statistical test. Discussion and reference to other work should be left to the discussion.

(i) Tables. Each table, headed by a self-explanatory title, must be double spaced on a separate page and numbered consecutively. Rules, particularly vertical ones, should be avoided. Each table should be referred to consecutively as Table 1 etc in the text.

(ii) Figures. These may be line drawings or photographs and all should be referred to consecutively in the text as Fig. 1 etc. Component parts of figures should be labelled A, B, C etc. Captions for figures should be self-explanatory and must not contain details of results.

Line drawings should not be larger than **twice** the final size and in no circumstances should exceed 170 x 250 mm. Line drawings should be as simple as possible, lines should be bold enough to stand reduction to about 0.25-0.35 mm. Preferred symbols are open and filled circles, squares and triangles, and these should be used consistently. Lettering should be kept to a minimum and should be self-explanatory and unambiguous and of sufficiently high quality and size to be clearly visible after reduction to final size.

Photographs should be the same size as they will appear in the journal and should be selected to fit neatly into one column (80 mm) or two columns (166 mm). Photographs should be labelled and numbered as for line drawings. For

microscopical preparations, scale bars with appropriate units (e.g. 50µm) must be provided; statements of magnification are not acceptable.

Colour figures may be accepted provided that they are of a very high quality and scientifically necessary. The final decision for use of colour will be at the discretion of the editors.

6. DISCUSSION. The results should neither be repeated in detail nor should new information be introduced. Speculation is encouraged but should not go beyond reasonable and testable hypotheses. The discussion should not attempt to be a mini-review.

7. REFERENCES. It is **essential** that the appropriate reference format for *Parasitology* is adhered to precisely.

(i) References in the text.

References should be kept to an essential minimum. Only references to published work or work actually “in Press” are permitted and under no circumstances should references to unpublished work, work in preparation or un-refereed abstracts be included (such data should be cited as *personal communications* or *unpublished observations* in the text).

References should be ordered chronologically in the text as follows:

Brown, A. (1995).

Brown, A. and Green, B. (1991).

For papers with more than two authors *et al.* should be used.

Brown, A. *et al.* (1994).

Brown, A. *et al.* (1992a).

Brown, A. *et al.* (1992b).

When authors are not directly referred to the reference should be in parentheses as follows:

All currently known COI sequences of *G. salaris* from rainbow trout (Hansen *et al.* 2003; Meinilä *et al.* 2002, 2004) are haplotype F.

(ii) List of References.

References, **which must be double spaced and listed alphabetically**, should begin on a separate page following the Discussion and Acknowledgements. The accuracy and

appropriateness of the references are solely the responsibility of the author and are not checked in the editorial office.

The format required by this journal is given below and, if in any doubt, authors should refer to a recent copy of the journal. Please note that the names of **all** authors should be given in **bold** font and that the journal name should be *italicized* and given **in full**, not abbreviated. Where known, the article Digital Object Identifier (DOI) should be included, at the end of the entry (see example below).

Journal references

Higgs, S., Snow, K. and Gould, E. A. (2003). The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 82-87. doi: 10.1016/S0035-9203(03)00004-X.

Books

Smyth, J. D. (1994). *Introduction to Animal Parasitology*, 3rd Edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Chapters in books

Grenfell, B. T., Dietz, K. and Roberts, M. G. (1995). Modelling the immunoparasitology of macroparasites in naturally-fluctuating host populations. In *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations* (ed. Grenfell, B. T. and Dobson, A. P.), pp. 362-383. Cambridge University Press, Cambridge.

WHO publications

World Health Organization (1995). *Onchocerciasis and its Control*. WHO Technical Report Series No. 852. World Health Organization, Geneva.

When referencing Parasitology Supplements

Jenkins, D. J. and MacPherson, C. N. L. (2003). Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology* **127** (Suppl.) S63-S72. doi: 10.1017/S0031182003003871.

On Acceptance

On acceptance to the journal the final version of the manuscript containing the following should be submitted.

Title Page, Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Captions to Figures

In particular, each table should occupy a separate page.

Please ensure that your figures are submitted separately at final publication size and are in the recommended file formats. Following these guidelines will result in high quality images being reproduced in both the print and the online versions of the journal.

Line artwork

Format: tif or eps

Colour mode: black and white (also known as 1-bit)

Resolution: 1200 dpi

Combination artwork (line/tone)

Format: tif or eps

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit)

Resolution: 800 dpi

Black and white halftone artwork

Format: tif

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit)

Resolution: 300 dpi

Colour halftone artwork

Format: tif

Colour mode: CMYK colour

Resolution: 300 dpi

Proofs: Page proofs will be forwarded as PDF files by E-mail to the corresponding author. These will already have been read for printer's errors but it is the responsibility of the author to ensure that no errors remain. **Only essential corrections should be made and authors will be charged for excessive alterations at the proof stage.** If corrections are deemed to be substantial **the paper will be rejected** and the author asked to resubmit their work for peer review.

(Revised 22/01/07)

CAPITULO II

Estudo do ciclo de vida e caracterização das formas imaturas de *Lutzomyia whitmani* criados em condições experimentais no município de São Luís – MA, Brasil.

Estudo do ciclo de vida e caracterização das formas imaturas de *Lutzomyia whitmani* criados em condições experimentais no município de São Luís – MA, Brasil.

Raquel Silva Fonteles; Gabriel Costa e Vasconcelos; Patrícia Castelo Branco Azevêdo; Jorge Luiz Pinto Moraes; Oliver Kuppinger; José Manuel Macário Rebêlo

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo. Laboratório de Entomologia e Vetores. Departamento de Patologia (UFMA). Praça Madre Deus 2, São Luís, MA - Brasil. CEP 65025-560. e-mail: macariorebelo@uol.com.br

RESUMO

Este estudo propôs-se a determinar o ciclo de vida e caracterizar as formas imaturas de *Lutzomyia whitmani*, incriminado como vetor da Leishmaniose Tegumentar (LT) no Maranhão. Para isso foi necessária a montagem e manutenção de uma colônia a partir de espécimes coletados no município de Axixá, área endêmica para LT no Maranhão. Assim observou-se 39,3 dias para o período do ciclo de vida total; forma elipsóide para os ovos, padrão de coloração de translúcido a amarelo para as larvas e tamanho constante de 1,5 mm para as pupas. A razão sexual foi de 1 macho para 1,3 fêmeas e os padrões de temperatura e umidade que minimizaram o surgimento de fungos e ácaros na colônia variaram de 26,2 a 27 °C e 65 e 72%. Em síntese, o ciclo de vida de *L. whitmani* é de cerca de um mês e 10 dias, desde que mantido os padrões de higienização e controle dos parâmetros físicos estabelecidos na colônia sendo esses dados importantes para a compreensão da biologia desse vetor, assim como, para a otimização de técnicas de manutenção de colônia, útil para subsidiar pesquisas em outras áreas e desenvolver estratégias de controle e prevenção da LT.

Palavras-chave: Ciclo de vida, colônia, Flebotomíneo

ABSTRACT

This study determined the cycle of life and characterized the immature forms of *Lutzomyia whitmani* incriminated to be the vector of the Tegumentar Leishmaniasis (LT) in Maranhão. In order to, establish and maintain a colony of *L. whitmani* in the laboratory, individuals were collected in the municipal of Axixá, endemic area of Leishmaniasis in Maranhão. It was found that the total life cycle was completed after 39,3 days, eggs revealed an ellipsoid shape, whereas the larvae's exhibited a translucent to yellow cuticles and the pupas had a constant size of 1.5 mm. The hatching offspring

represented a sexual relation of 1 male to 1.3 females. Temperature and humidity parameters of colony that minimize a contamination with fungal and mite varying between 26.2⁰C to 27⁰C and 65% to 72%. In summary, the life cycle of *L. whitmani* is about a month and ten days since maintained the standards of hygiene and control of physical parameters established in the colony. These data are important for understanding the biology of the vector, as well as for the optimization of techniques for the maintenance of colony, useful to support research in other areas and develop strategies for control and prevention of LT.

Keywords: Life cycle, colony, Phlebotomies

Os flebotomíneos são insetos cujo ciclo de vida é caracterizado pela holometabolia, ou seja, compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios que diferem sensivelmente entre si, no que concerne ao tamanho), pupa e adulto (Forattini 1973).

As fêmeas apresentam um aparelho bucal do tipo sugador-pungitivo adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (Forattini 1973). Isso se deve ao hábito hematofágico que essas fêmeas possuem, pois algumas proteínas existentes no sangue dos vertebrados são essenciais para maturação de seus ovócitos.

Após a hematofagia e a cópula, as fêmeas de flebotomíneos colocam os ovos, que normalmente são elípticos e inicialmente esbranquiçados, mas logo adquirem coloração castanho escuro, sobre um substrato úmido no solo com alto teor de matéria orgânica. A postura é feita isoladamente ou em pequenos grupos de ovos, que ficam aderidos ao substrato graças a uma substância viscosa rica em ácidos graxos liberada no momento da postura (Passos et al. 2003).

As larvas são terrestres, pequenas, brancas, de aspecto vermiforme, apresentando no 1º estágio um par de cerdas caudais e nos demais, dois pares. Logo após a eclosão, alimentam-se dos corpos dos adultos mortos e de outras matérias orgânicas disponíveis (Ferro et al. 1997).

As pupas têm coloração esbranquiçada ou amarelada, escurecendo progressivamente à medida que se aproxima a eclosão dos adultos que emergem por uma fenda em forma de T (Delgado et al. 1993). Não permanecem imóveis podendo executar movimentos de flexão e extensão, mas se encontram fixas no substrato.

Os adultos, ao emergirem da pupa, permanecem por pouco tempo inativos e o aparelho bucal das fêmeas demora cerca de 24 a 48 horas para enrijecer e tornar-se apto a realização do repasto sanguíneo. Desde a eclosão apresentam dimorfismo sexual aparente (Brazil & Brazil 2003).

Além da hematofagia apresentada pela fêmea, os adultos (macho e fêmea) se alimentam de açúcares (Cameron et al. 1995), provenientes de néctar e seiva de plantas, essenciais para que estes insetos possam realizar atividades como vôo e cópula.

Dentre as espécies de flebotomíneos mais estudadas, podemos destacar *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* incriminada no Maranhão e em outras regiões como vetor da Leishmaniose Tegumentar (LT). Esta é uma espécie com ampla distribuição na América do Sul (Young & Duncan 1994) e no Brasil, desenvolveu hábito antropofílico ocorrendo nos domicílios humanos e abrigos de animais em algumas áreas do Nordeste (Brandão-Filho et al. 1994). No Maranhão, *L. whitmani* vem se adaptando à zona periurbana podendo determinar um padrão de transmissão urbana da leishmaniose no Estado (Leonardo & Rebêlo 2004).

Pela dificuldade do encontro dos criadouros naturais de *L. whitmani*, são praticamente inexistentes os relatos na literatura sobre suas formas imaturas (ovo, larva e pupa) e os períodos entre os estádios e estágios de seu ciclo vital.

Assim, pretende-se com esse trabalho estudar o ciclo de vida e as formas imaturas de *L. whitmani*, sob condições de laboratório e fornecer parâmetros relacionados à temperatura e humidade para a otimização de técnicas relacionadas à manutenção de colônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

As coletas foram realizadas no Município de Axixá (2°50'08'' S e 44°03'14'' W), região norte do Estado do Maranhão, onde inquéritos entomológicos e epidemiológicos realizados previamente mostraram-se preocupantes em relação à ocorrência de leishmaniose. Os locais de coleta foram selecionados em regiões com maior número de casos de LT e características essencialmente rurais.

Os insetos foram capturados com uso de quatro armadilhas luminosas do tipo HP que funcionaram das 18:00 h às 06:00 h, ininterruptamente, uma vez por mês durante 10 meses totalizando um esforço de captura de 480 horas.

Após as coletas, os insetos retidos nas gaiolas foram transportados para o Laboratório onde foi estabelecida a colônia.

Montagem e manutenção da colônia de *L. whitmani*

Após a triagem através de caracteres morfológicos externos, os indivíduos de *L. whitmani* (machos e fêmeas) foram transferidos para gaiolas de 30cm³ para que as fêmeas realizassem o repasto sanguíneo em camundongos da linhagem BALBc

disponíveis no biotério da Universidade Federal do Maranhão. Estes foram anestesiados com Ketamina/Xilasina e em seguida posicionados com a face ventral para cima, expondo as áreas corporais mais glabras, de modo a facilitar a alimentação das fêmeas. Esse processo transcorreu durante cerca de quarenta minutos, em total ausência de luz.

Após o repasto, os flebotomíneos foram colocados em potes de polietileno de 200 ml modificados por um corte na parte inferior e acréscimo de uma camada de 1 cm de espessura de gesso, para a retenção de umidade. Os potes foram cobertos por uma espécie de tecido tipo vual fixado por ligas, criando um ambiente propício a realização da cópula.

Os potes foram armazenados em uma câmara biológica (B.O.D.) onde a temperatura e umidade (obtidos com termômetro e higrômetro), inicialmente estabelecidas de acordo com Azevedo (2007) foram sendo ajustadas até atingirem valores que proporcionaram uma taxa de natalidade de adultos considerada satisfatória, ou seja, correspondente a cerca de 10% do número estipulado de fêmeas trazidas do campo. A umidade no interior dos potes e dos organizadores era controlada com a colocação de água destilada na região constituída de gesso e por algodões embebidos nas extremidades dos organizadores.

Para a aquisição de energia voltada a atividades como o vôo e a cópula, foram colocados em cima da tela, fiapos de algodão embebidos em uma diluição 1:1 de mel e água destilada.

Após a ovipostura, os adultos mortos foram retirados dos potes de polietileno e as fêmeas identificadas seguindo a proposta de Young and Duncan (1994) para confirmação da espécie. À medida que as larvas eclodiam era acrescido ração (matéria orgânica) para alimentá-las até o último estágio. Esta ração é composta por fezes de coelho seca, terra vegetal e ração de peixe, na proporção 1:1:1 (fórmula adaptada da

sugerida por Brazil & Brazil 2003) e ao final do seu preparo é autoclavada, para diminuir o risco de contaminação por microorganismos na colônia.

À medida que os adultos foram eclodindo, eram transferidos para outros potes, com auxílio do capturador manual tipo Castro, para serem utilizados em outros experimentos científicos.

Em todos os estágios, os potes com as formas imaturas foram limpos com auxílio de seringas e do estereomicroscópio para evitar a proliferação de fungos e ácaros e o tempo entre os estádios larvais e estágios foram anotados em etiquetas no pote assim como a quantidade de indivíduos nascidos e o sexo.

Determinação da quantidade de ovos postos por fêmea

A cada coleta, depois de se alimentarem em camundongo, duas fêmeas eram separadas em potes diferentes, isoladas dos outros flebotomíneos apenas com cerca de 5 machos e assim que ocorria a oviposição, os ovos eram contados tornando possível a quantificação destes por fêmea.

Caracterização das formas imaturas

A partir de 20 ovos resultantes de dez ciclos reprodutivos, as formas imaturas (ovos, larvas em seus diferentes estádios e pupas) foram caracterizadas em relação ao tamanho e padrão de coloração com auxílio de estereomicroscópio para observação direta, imagens fotográficas e régua micrométrica.

Testes estatísticos

Após cada ciclo, dos dados coletados foram determinadas as médias aritméticas e em seguida o desvio padrão entre os estágios e estádios larvais. A média aritmética e o

desvio padrão foram estabelecidos também para os dados referentes à quantidade de ovos postos por fêmea.

Para analisar as diferenças na proporção de espécimes nascidos, por sexo, foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2), onde as diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade (p) do erro foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Utilizando-se dos parâmetros de temperatura e umidade para crescimento recomendados na literatura (Azevedo 2007), não conseguimos estabelecer e manter uma colônia de *L. whitmani* devido à contaminação microbiológica por fungos e ácaros. Entretanto, depois de modificados os parâmetros de temperatura e umidade que variaram de acordo com a tabela I foi possível estabelecer e manter uma colônia de *L. whitmani* com sucesso.

Assim, durante o período de manutenção da colônia foram determinadas as condições laboratoriais relacionadas à umidade e temperatura que minimizaram a contaminação por fungos e ácaros permitindo a ocorrência de taxas de natalidade consideradas satisfatórias para *L. whitmani* (Tabela I).

Tabela I. Condições satisfatórias para o desenvolvimento de *L. whitmani* em laboratório no município de São Luis.

	TEMPERATURA (Média)	UMIDADE (Média)
Ambiente Externo	27 C	65%
Interior da B.O.D	26 C	68%
Interior dos organizadores com ovos	26,2 C	72%
Interior dos organizadores com Larvas	26,2 C	70%
Interior dos organizadores com Pupas	26.2 C	68%
Interior dos organizadores com Adultos	26,2 C	68%

As fêmeas trazidas do campo obtiveram uma média de 7,5 dias com desvio padrão de $\pm 1,15$ entre o repasto sanguíneo e a ovipostura. Os demais intervalos de tempo e ciclo total se deram de acordo com a tabela II.

Tabela II. Resumo dos intervalos de tempos entre os estádios e estágios de *L. whitmani* em condições laboratoriais.

Estádio / Estágio	Tempo (dias)
Ovo – L1	6,2 ($\pm 2,58$)
L1 – L2	4,2 ($\pm 1,5$)
L2 – L3	6,7 ($\pm 2,67$)
L3 – L4	4,9 ($\pm 2,1$)
L4 – Pupa	9,8 ($\pm 1,75$)
Pupa – Adulto	7,5 ($\pm 3,4$)
Ciclo total	39,3

Em média, cada fêmea ovipôs 43,7 ($\pm 5,48$) ovos. Estes possuíam como principais características morfológicas o formato elipsóide, com coloração marrom escuro e um tamanho de 0,3 milímetros de comprimento por 0,07 de largura em sua porção medial (figura I).

As larvas foram medidas diariamente onde se determinou um tamanho padrão de mudanças entre os três últimos estádios larvais. Seu formato durante todos os estádios permaneceu cilíndrico tipo vermiforme e o padrão de coloração variou de translúcido à amarelo a medida que iam avançando os estádios. Durante o estágio L1 (único que pode ser distinguido, pois apresenta apenas duas cerdas na porção terminal de seu corpo) o tamanho das larvas variou de 0,6 à 0,9 mm, em L2 as larvas já com quatro cerdas na porção terminal tiveram uma variação de tamanho de 1 a 1,4 mm, no terceiro estágio larval a variação de comprimento esteve entre 1,5 e 1,9 mm e o último estágio variou de

2 a 2,4 mm (figura I). As pupas obtiveram um tamanho constante de 1,5 mm (figura I) e seu padrão de coloração variou de amarelo claro à quase negro bem próximo ao momento da eclosão.

Figura I. Caracterização das formas imaturas de *L. whitmani* em condições laboratoriais

A razão sexual dos indivíduos de *L. whitmani* nascidos na colônia foi de 1 macho para 1,3 fêmeas, ou seja, de um total de 374 indivíduos que alcançaram o estágio adulto, 161 (43,1%) eram machos e 213 (56,9%) fêmeas, não havendo diferença significativa entre estes valores ($p=0,2113$).

DISCUSSÃO

A manutenção de insetos em laboratório torna-se importante à medida que são utilizados em experimentos de natureza distinta. Quando se trata de um grupo de grande importância para saúde pública, como é o caso dos flebotomíneos, estabelecer padrões de manutenção em condições laboratoriais pode subsidiar importantes experimentos relacionados a prevenção ou erradicação de doenças infecciosas ao homem e outros animais.

Colônias de outras espécies de flebotomíneos (*L. lenti*, *L. longipalpis* e *L. intermedia*) foram estabelecidas no Estado de Minas Gerais a temperaturas que variavam entre 26 e 28 °C e umidade relativa entre 80 e 85% (Brazil et al. 1997) e no município de São Luis (*L. longipalpis*) a temperatura e umidade que variaram entre 26,9- 27,2° e 62,4- 65,8%, respectivamente (Azevedo 2007). Quando se compara estes dados, aos obtidos neste trabalho, observa-se que a umidade média para manutenção de colônia de *L. whitmani* está entre esses dois dados presentes na literatura, mas a temperatura encontra-se entre o padrão de variação.

Neste trabalho verificou-se que umidades mais elevadas propiciam o desenvolvimento de fungos e ácaros prejudicando sensivelmente o desenvolvimento de colônia. Talvez esse resultado seja um reflexo do que vem ocorrendo em condições naturais, onde tais organismos favorecidos por altos índices de umidades, característicos do norte do Maranhão, devido à sua posição equatorial, funcione como controladores de populações de flebotomíneos.

O ciclo de vida dos flebotomíneos pode variar de 30 a 90 dias, onde o período entre a oviposição e a eclosão ocorre entre 6 e 17 dias, originando as larvas que por sua vez podem demorar de 15 a 70 dias para se transformar em pupa e 7 a 14 dias a mais para eclodirem os adultos (Pessoa & Barreto 1948). Esses dados corroboram as médias entre os estágios do ciclo de vida de *L. whitmani* encontrados neste trabalho.

Experimentos realizados com colonização de 3 espécies do gênero *Lutzomyia* (*L. lenti*; *L. longipalpis* e *L. intermedia*) demonstraram períodos de ciclo de vida bem próximos ao deste estudo, incluindo tempo entre os estágios e estádios larvais (Brazil et al. 1997). Azevêdo (2007) em seu estudo em São Luis com *L. longipalpis* encontrou médias no ciclo de vida desta espécie ($38,1 \pm 2$) abaixo às encontradas neste trabalho.

Segundo Pessoa & Barreto (1948) as fêmeas de flebotomíneos põem entre 40 e 70 ovos corroborando com as médias encontradas neste trabalho.

Fêmeas de *L. longipalpis* criadas em condições laboratoriais demoravam de 6 a 13 dias para ovipôr após a realização do repasto sanguíneo (Luitgards-Moura et al. 2000). Os dados de pré-oviposição deste trabalho encontra-se dentro deste intervalo mais com uma variação menor em relação ao numero de dias, de 6 a 10. Isso pode estar relacionado, entre outros fatores, já que se trata de espécies diferentes, a uma maior estabilidade de temperatura e umidade da colônia aqui estudada, pois o desenvolvimento embrionário pode variar principalmente de acordo com a temperatura

que mesmo estando em um nível considerado ótimo, pode sofrer variações sutis (mesmo em condições de laboratório) e levar a sensíveis modificações no tempo de incubação (Scorza et al. 1968).

Além disso, quantidades excessivas de água no interior dos potes de polietileno, no início do ciclo, podem formar uma película líquida sobre os ovos, o que é considerado prejudicial, por provocar retardamento no desenvolvimento embrionário (Barretto, 1942).

Em relação ao período de mudança entre os estádios larvais, nenhum trabalho com esta espécie foi feito determinando o tamanho das larvas por estágio de desenvolvimento, assim este trabalho pode ser considerado pioneiro. No estudo de Brazil et al. (1997), apesar de inferir períodos para os estádios larvais, não coloca o tamanho das larvas por estágio como foi determinado neste estudo.

É importante ressaltar que flutuações térmicas durante o período de desenvolvimento larval exercem ação nociva ao desenvolvimento das larvas, talvez porque provoquem nas larvas um maior gasto metabólico para se ajustar às sucessivas variações de temperatura (Barretto 1942). Outro fator importante observado neste estudo é que as formas jovens são mais sensíveis, e sua resistência aumenta à medida que se aproximam do último estágio corroborando com a literatura (Barretto 1942).

Além disso, um ponto importante no desenvolvimento larval é a intensidade de luz, pois sua ausência constitui um fator favorável para o desenvolvimento das larvas (Forattini 1973), assim, neste estudo esses padrões foram mantidos, uma vez que, as larvas eram mantidas na ausência de luz no interior de uma câmara biológica (B.O.D).

Em relação à razão sexual da primeira geração da colônia, neste trabalho, observa-se um ligeiro predomínio no número de fêmeas em relação aos machos (1,3:1)

discordando do trabalho de Santos et al. (1991), cuja proporção de machos e fêmeas na primeira geração de uma colônia é de 1: 0,92.

Em síntese, um conhecimento profundo de características do ciclo de vida e o papel da contaminação por fungos e ácaros que possam limitar o crescimento das formas imaturas de flebotomíneos sob certos parâmetros como temperatura e umidade, observados nesse estudo, pode facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de controle da transmissão de LT. Isso torna importante o desenvolvimento de futuros estudos acerca da identificação das espécies de fungos e ácaros responsáveis pelo controle das formas imaturas desta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e a FAPEMA pelas bolsas de Mestrado concedidas.

REFERÊNCIAS

- Azevedo PCB 2007. Estudo do ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis* criados em laboratório no município de São Luis – MA. Brasil, Monografia, Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, 39 pp.
- Barretto MP 1942. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera: Psychodidae), Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São.Paulo, São Paulo.
- Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA 1994. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in “Zona da Mata” region. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 89: 445-449.

- Brazil RP, Carneiro VL, Andrade Filho JD, Alves JCM, Falcão AL 1997. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil* 26: 191-193.
- Brazil RP, Brazil BG, 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, p 367.
- Cameron MM, Pessoa FA, Vasconcelos AW, Ward RD 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medicine and Veterinary Entomology* 9: 263-272.
- Delgado O, Castes M, White Jr AC, Kreutzer, RD 1993. *Leishmania colombiensi*s in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:145-147.
- Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison AC 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 34: 719-728.
- Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.
- Leonardo FS, Rebêlo JMM 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 282-284.
- Luitgards-Moura JF, Castellon EG, Rosa-Freitas MG 2000. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 251-257
- Passos FO, ES Lorosa, Rebêlo JMM 2003. Fonte alimentar sangüínea e peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae: Phlebotomiane). *Caderno de Saúde Pública*. 19: 109-118.
- Pessôa SB, Barreto MP 1948. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro. Ministério da Educação e Saúde. Imprensa Nacional.

Santos MC, Williams P, Ferreira M 1991. Changes in sex ratio during attempts to establish a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasitologia* 33: 169-176.

Scorza JV Gomez I, Ramirez M 1968. Observaciones biologicas sobre algunos flebotomos de “Rancho Grande” (Venezuela). Notas bionómicas sobre *Phlebotomos townsend* Ortiz, 1959 y *P. vexillarius* Fairchild e Hertig, 1952. *Acta Biology* 6: 28-40.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies; Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Entomology Institute* 54: 1-881.



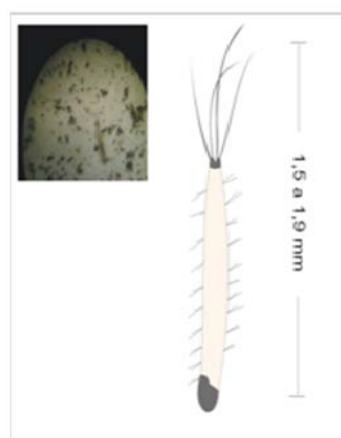
OVO



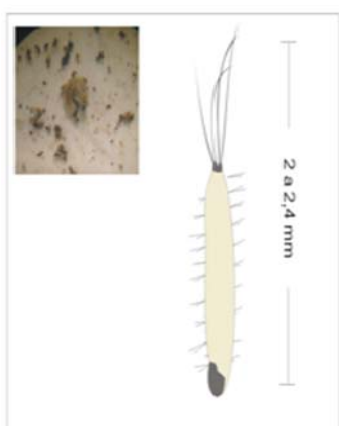
L1



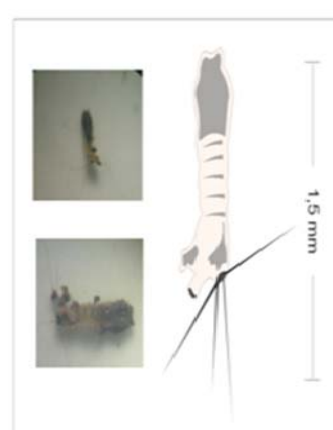
L2



L3



L4



PUPA

Fig I. Caracterização das formas imaturas de *L. whitmani* em condições laboratoriais

Normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidos juntos em arquivo único. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O manuscrito deve ser apresentado na seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

- No texto, usar o sobrenome do autor e a data:
Lutz (1910) ou (Lutz 1910).
Com dois autores, a forma é:
(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).
- Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:
Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).
Nas referências, usar os seguintes estilos:
- Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

- Livro ou Tese

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

- Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

- Artigo de revista na Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

- Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

- Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

- Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from:

<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET

Acesso aberto:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

- **Ilustrações:** figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- **Figuras:** as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para

consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- **Tabelas:** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

• **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

• **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- uma declaração de affidavit fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.
- uma declaração de copyright fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.
- Taxas: a revista não cobra taxas para publicação.
- Provas: serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase

CAPITULO III

Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* em área de transmissão de leishmaniose tegumentar no Maranhão, Brasil.

Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* em área de transmissão de leishmaniose tegumentar no Maranhão, Brasil.

Blood feeding preference of *Lutzomyia whitmani* in transmission area of tegumentar leishmaniasis in Maranhão, Brasil.

Raquel Silva Fonteles¹ Gabriel Costa e Vasconcelos¹ Patrícia Castelo Branco Azevêdo¹
Gildevan Nolasco Lopes¹ Jorge Luiz Pinto Moraes² Elias Seixas Lorosa³ Oliver
Kuppinger⁴ e José Manuel Macário Rebêlo⁴

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

1. Mestrado em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, MA. 2. Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão. 3. Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 4. Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, MA.

Endereço para correspondência: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo. Laboratório de Entomologia e Vetores. Departamento de Patologia (UFMA). Praça Madre Deus 2, São Luís, MA - Brasil. CEP 65025-560. e-mail: macariorebello@uol.com.br. Fone: (98) 2108-8542

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar as fontes de alimento sanguíneo de fêmeas de *Lutzomyia whitmani*, espécie de flebotomíneo incriminada no Maranhão como principal vetor da Leishmaniose Tegumentar (LT). Para isso, fêmeas desta espécie coletadas no município de Axixá, área com um dos maiores números de casos de LT em humanos no Maranhão, foram analisadas utilizando a técnica da precipitina. Dos indivíduos analisados, 90% apresentaram reação a algum tipo de anti-soro e dentre estes, 73% apresentaram reações do tipo simples com predominância para sangue de ave (22,2%), roedor (14,3) e humano (12,7%). Nas reações duplas predominaram as combinações ave/humano (6,3%), ave/mucura (4,8%), boi/humano e mucura/humano (3,2%). Assim, concluímos que seres humanos, animais domésticos e sinantrópicos constituem fonte alimentar sanguínea para *L. whitmani* podendo desempenhar um papel importante no ciclo de transmissão da LT explicando os casos da doença em Axixá.

Palavras-chave: *Lutzomyia whitmani*. Leishmaniose Tegumentar. Alimentação Sanguínea. Precipitina.

ABSTRACT

Lutzomyia whitmani females are incriminated to be the vectors for Tegumentar Leishmaniasis (LT) in Maranhão. The blood nutrient species preference of 70 *Lutzomyia whitmani* females collected in the town of Axixá, exhibiting one of the most cases of LT in human beings in the state of Maranhão, was determined by the preceptitin technique. 90% of all examined sandflies showed a positive immune reaction and 73% of them reacted for a single animal species being birds (22%), followed by rodents (14.3%) and humans (12.7%). The vector blood preference, examined for 2 different animals were the following: bird / human (6.3%) bird / opossum (4,8%) , ox / human (3.2%) and opossum / human (3.2%). We conclude that human beings, domestic and sinantropic animals are *Lutzomyia whitmani* nutrient sources and thus may serve as *Leishmania* parasite reservoirs. This may explain why people in Axixá are suffering from Leishmaniosis Tegumentar.

Keywords: *Lutzomyia whitmani*. Tegumentar Leishmaniasis. Blood nutrients. Precipitin.

Lutzomyia whitmani é uma espécie de flebotomíneo incriminada em muitas regiões como principal vetor de Leishmaniose Tegumentar – LT⁶ e por isso, nos últimos anos, vem sendo utilizada freqüentemente em estudos experimentais relacionados à taxa de infecção por *Leishmania*, o que proporciona um melhor conhecimento desta como vetor⁸. Apesar de *L. whitmani* ser freqüentemente encontrada em abrigos de animais domésticos, pouco se conhece a respeito de seu comportamento alimentar.

A atração que diferentes animais silvestres e domésticos exercem sobre os flebotomíneos como fonte alimentar constitui-se importante para o conhecimento das relações hospedeiro - vetor nos diversos ambientes, sobretudo em áreas com transmissão de leishmanioses.

As ações humanas sobre o meio ambiente atuam na seleção das espécies de flebotomíneos e mamíferos reservatórios de *Leishmania*, permitindo àqueles com maior valência ecológica se adaptarem ao ambiente antrópico. Essas ações parecem favorecer a presença desses insetos e mamíferos no domicílio e peridomicílio, explicando, em parte, a persistência das leishmanioses nesse tipo de ambiente. Além disso, as habitações humanas de má qualidade e em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de saneamento básico são condições comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos⁷. Nessas áreas, os mamíferos reservatórios de *Leishmania* têm sobrevivido e os flebotomíneos têm sido capturados em grande número¹⁰ favorecendo a infecção humana e de animais domésticos.

Os estudos das fontes sangüíneas de flebotomíneos têm sido muito úteis no esclarecimento da epidemiologia das leishmanioses, podendo vir a auxiliar as atividades de controle e vigilância dessas doenças⁴.

Assim, o estudo do conteúdo estomacal de insetos hematófagos é de grande significado ecológico e epidemiológico, pois além de permitir descobrir a identidade dos hospedeiros que servem de alimento aos flebotomíneos, por ocasião do repasto sanguíneo, pode fornecer subsídios para a indicação de reservatórios de *Leishmania*.

Neste trabalho, estuda-se a fonte alimentar sanguínea de uma população de *L. whitmani* com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre possíveis reservatórios de *Leishmania* em uma das áreas com maior número de casos de LT em humanos no Maranhão, onde estudos prévios sobre taxa de infecção natural e levantamento de casos de LT demonstraram a presença do parasita nos flebotomíneos e de grande quantidade de pessoas contaminadas revelando que há infecção circulando na região⁵.

MATERIAIS E METODOS

Área de Estudo

As coletas foram realizadas no Município de Axixá ($2^{\circ}50'08''$ S e $44^{\circ}03'14''$ W), localizado na região norte do estado do Maranhão, na Amazônia Maranhense e sua cobertura vegetal inclui o manguezal e a restinga. (figura I).

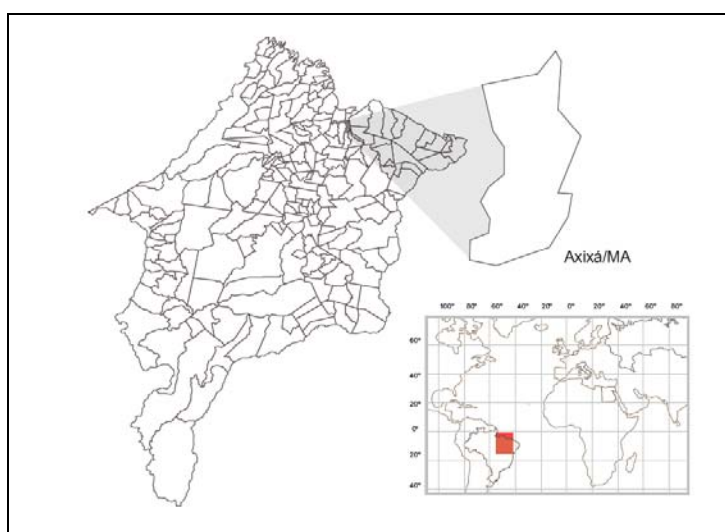


Figura I. Localização da área de estudo, Município de Axixá - MA

O clima é tropical mesotérmico e úmido, com duas estações bem definidas, uma chuvosa de janeiro a junho, e uma estação de estiagem, de julho a dezembro. Os índices pluviométricos podem atingir 2000mm/ano. As temperaturas são elevadas o ano todo (média de 27°C), com variação anual pequena.

Os locais de coleta foram selecionados no peridomicílio de bairros com maior número de casos de LT e características essencialmente rurais, o que permitiu o encontro do vetor em frequências favoráveis à realização do trabalho.

Os espécimes foram capturados com uso de quatro armadilhas luminosas em miniatura tipo CDC (Center Control Disease), alimentadas por 4 pilhas alcalinas grandes de 1,5 volts, que foram instaladas no peridomicílio de 10 casas rurais. Estas funcionaram das 18:00 h às 06:00 h, ininterruptamente, uma vez por mês durante 10 meses. Os insetos retidos foram triados com auxílio de esteromicroscópio para separação de fêmeas ingurgitadas de *L. whitmani*.

Para determinação das fontes alimentares sangüíneas, os insetos foram analisados pelo teste da reação da precipitina na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde o tubo digestório dos espécimes foi retirado e o conteúdo estomacal foi triturado em salina a 0,85%. Este macerado foi deixado por 12 horas à temperatura entre 4 e 8°C e logo após, centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm, e o sobrenadante foi exposto a anti-soros de humano, ave, boi, cão, cavalo, gato, porco, roedor, mucura, tatu, lagarto e sapo.

RESULTADOS

No total foram examinadas 70 fêmeas de *L. whitmani* e 90% apresentaram reação aos diversos anti-soros utilizados neste experimento.

Das fêmeas que apresentaram reação a algum tipo de anti-soro, cerca de 73% foi do tipo simples, ou seja, reagiram a apenas um único anti-soro e 27% apresentaram reações

duplas, reagindo a dois anti-soros de combinações diversas. No primeiro caso as fêmeas reagiram a 6 diferentes tipos de anti-soro e no segundo a 10 combinações diferentes. Nas reações simples, anti-soros de ave, roedor e humano predominaram com 22,2%, 14,3% e 12,7% respectivamente (Tabela I). Já nas reações duplas, as combinações ave/humano (6,3%) e ave / mucura (4,8%) se sobressaíram diante das demais (Tabela I).

Ainda com relação às reações duplas, 11,4% do total de fêmeas positivas para algum tipo de anti-soro, apresentaram combinações com anti-soro de humano (ave/humano, boi/humano e mucura/humano).

Tabela I. Relação entre número de fêmeas de *L. whitmani* e reação aos diferentes tipos de anti-soros.

Anti-soro	Nº de fêmeas	% de fêmeas
Ave	14	22,2
Humano	8	12,7
Porco	4	6,3
Mucura	7	11,1
Roedor	9	14,3
Boi	4	6,3
Mucura/Porco	1	1,6
Ave/ Mucura	3	4,8
Ave/Boi	1	1,6
Ave/Humano	4	6,3
Ave/Roedor	1	1,6
Boi/ Mucura	1	1,6
Boi /Humano	2	3,2
Mucura/Humano	2	3,2
Mucura/Roedor	1	1,6
Boi/Roedor	1	1,6
Total	63	100

Levando em consideração os dois tipos de reação, as aves foram o tipo de fonte alimentar mais procurada pelos insetos com 28,75% do total de fêmeas positivas para algum tipo de anti-soro (Figura II).

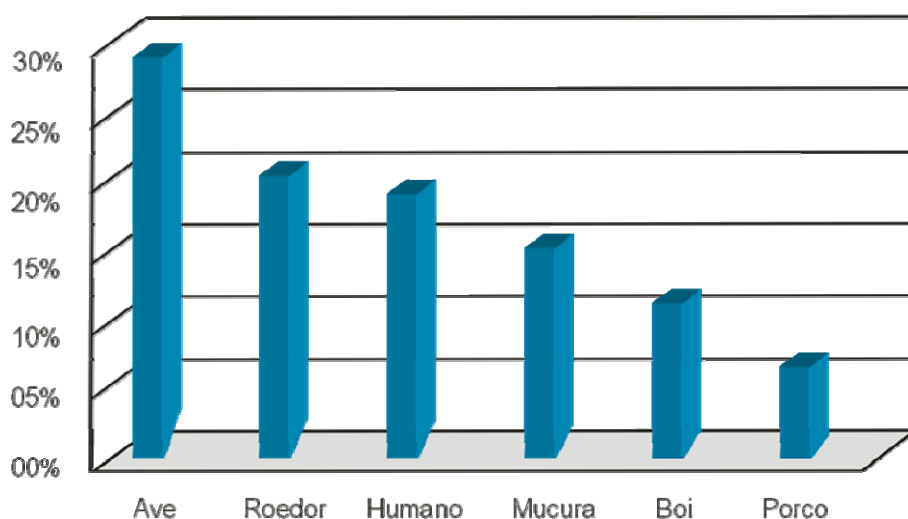


Figura II. Preferência alimentar de fêmeas de *Lutzomyia whitmani* do município de Axixá, Estado do Maranhão.

DISCUSSÃO

Investigar o conteúdo estomacal de insetos hematófagos constitui-se em um importante estudo principalmente quando se trata de espécies incriminadas na transmissão de microorganismos patogênicos com é o caso de *L. whitmani*.

Utilizando-se da reação da precipitina como metodologia para detectar a fonte alimentar sanguínea, neste trabalho observou-se que *L. whitmani* possui um comportamento bastante eclético, uma vez que sugou o sangue de aves e mamíferos domésticos e sinantrópicos, incluindo ainda na sua dieta, o sangue humano. O caráter oportunista desta espécie já foi verificado por outros autores^{11,2} e constitui um aspecto ecológico de grande relevância na epidemiologia da LT.

A análise do conteúdo estomacal de fêmeas de flebotomíneos, por qualquer um dos métodos utilizados (precipitina, ELISA ou dot-ELISA), tem mostrado que os flebotomíneos, de modo geral, ajustam o seu padrão alimentar de acordo com a disponibilidade de hospedeiros, mostrando o oportunismo desses dípteros que sugam uma ampla variedade de vertebrados ¹².

A presença de animais domésticos e a possibilidade deles virem a participar como hospedeiros sangüíneos dos flebótomos podem favorecer a aproximação e a manutenção destes insetos no peridomicílio ⁴.

Neste estudo realizado em Axixá, área endêmica para LT no Maranhão, verificou-se que nas casas onde não havia abrigo de animais domésticos, as capturas não eram bem sucedidas, caracterizando que a presença de *L. whitmani* está diretamente relacionada à presença destes animais.

Notavelmente, *L. whitmani* tendeu a sugar mais sangue de ave neste estudo, uma vez que este grupo predominou em relação aos demais nas reações duplas e simples. Isto provavelmente pode ser explicado pela grande quantidade de casas com galinheiros no município e Axixá. Esse resultado mostra a grande influência atrativa que estas aves têm em relação à fonte de alimentação de *L. whitmani*.

Por outro lado, no município de Buriticupu, na região amazônica do estado, a oeste, *L. whitmani* apresentou maior associação com sangue de roedores (44,4%) e de eqüinos (22,2%) e menos sangue humano (11,1%), apesar das aves (galinhas) estarem presentes em 87% das residências ⁹.

Um forte indício da atratividade que as galinhas exercem sobre os flebotomíneos foi observado na Vila Bom Viver, município da Raposa localizado na Ilha de São Luis, MA, quando a presença de *L. longipalpis*, incriminado como vetor da *L. chagasi*

causador da Leishmaniose Visceral estava diretamente relacionado com a presença de galinhas no peridomicílio das casas onde foram realizadas as coletas ⁴.

Apesar da literatura não apresentar nenhum relato de que aves sejam reservatórios de *Leishmania*,⁴ sugere que esta ave tenha um papel muito importante na peridomiciliação do *L. longipalpis* e *L. whitmani*, pois funcionam como chamariz para os vetores, mantendo-os no ambiente humano. Este aspecto foi verificado em estudos realizados nos Municípios da Raposa¹ e de São José de Ribamar³ na Ilha de São Luís, quando uma grande quantidade de *L. longipalpis* foram capturados no ambiente peridoméstico, utilizando-se a galinha como isca.

O segundo grupo de animais mais sugados pelas fêmeas de *L. whitmani* foi o dos roedores, considerados animais sinantrópicos. A presença destes vertebrados no peridomicílio como visitantes freqüentes foi relatada pelos moradores da região onde foram realizadas as coletas. Este fato mostra a grande necessidade de estudar estes animais como possíveis reservatórios da *Leishmania*.

Um dado importante a ser observado é a ausência de reação para anti-soro de cães apesar da presença destes no peridomicílio das casas onde foram realizadas as coletas mostrando a preferência das fêmeas de *L. whitmani* a vertebrados domésticos como as galinhas (aves) e a animais sinantrópicos ao peridomicílio como roedores e mucuras.

Outro fato que merece grande destaque é a presença do homem como terceiro grupo mais utilizado pelas fêmeas para o repasto sanguíneo, sendo superado somente pelas aves e roedores, demonstrando o alto grau de antropofilia desta espécie. Além disso, o homem esteve presente em reações duplas com aves, boi e mucura onde, este último, pode ser o potencial reservatório da *Leishmania*, uma vez que existem casos positivos da doença na região das coletas. O mesmo pode ser observado em um trabalho

desenvolvido na Costa Rica, onde foi capturado um número significativo de flebotomos em iscas humanas¹³.

A presença de exemplares de *L. whitmani* alimentados, ao mesmo tempo, com sangue humano e mucura no peridomicílio nos leva a crer na hipótese de que a transmissão da infecção esteja ocorrendo nos ambientes peri e intradomicílio, ou seja, todos os elos da cadeia de transmissão da *Leishmania* estão presentes nestes ambientes no Município de Axixá, o que pode explicar o número de casos de Leishmaniose Tegumentar que vêm sendo notificados nos últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e a FAPEMA pelas bolsas de Mestrado concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo JC, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL. Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do Município da Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y Vectores 7: 33-47, 2000.
2. Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JL. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 35: 299-306, 2002.
3. Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) do Município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y Vectores 7: 19-32, 2000.

4. Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). Cad Saúde Pública 19: 1373-1380, 2003.
5. Fonteles RS. Ecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania* no município de Axixá - Maranhão, Brasil. [Monografia]. Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, 39, 2007.
6. Galati EAB. Flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R. Morfologia e taxonomia. Rio de Janeiro, Fiocruz, p. 23-51, 2003.
7. Lima AP, Minelli L, Comunello E, Teodoro U. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. An Bras Dermatol 77: 681-92, 2002.
8. Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 39: 540-543, 2006.
9. Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa EL, Rêbello JMM. Preferência alimentar sangüínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. Cad. Saúde Pública 24: 2183-2186, 2008.
10. Teodoro U. Características ecológicas de Flebotomíneos (Diptera Psychodidae) em habitats antrópicos, município de Jussara, Paraná, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 29: 625-6, 1996.
11. Teodoro U, Alberton D, Kühl JB, Santos ES, Santos DR, Santos AR, Oliveira O, Silveira TGV, Lonardoní MVC. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* em área urbana do município de Maringá, Paraná. Rev. Saúde Pública 137: 651-656, 2003.

12. Velo E, Paparisto A, Bongiorno G, Muccio T, Khoury C, Bino S, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite* 12: 45-49, 2005.
13. Zeledon R, Murillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecologia de *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 455-459, 1984.

Normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Objetivo e política editorial

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical destina-se à publicação de trabalhos científicos relacionados às doenças infecciosas e parasitárias, medicina preventiva, saúde pública e assuntos correlatos.

A revista tem periodicidade bimestral e aceitará trabalhos de pesquisadores brasileiros ou estrangeiros desde que obedeçam às normas e que sejam aprovados pelos relatores indicados pelos Editores.

1. Além de Artigos, a revista publica Comunicações para a divulgação de resultados de ensaios terapêuticos, notas prévias, relatórios técnicos, relatos de casos, cartas ao editor, fatos históricos, resenhas bibliográficas e resumos de teses. Artigos de revisão e editoriais serão publicados por solicitação do Corpo Editorial.

2. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, digitados em espaço duplo, deixando margem de 3 cm à esquerda e remetidos em três vias ao endereço abaixo, sendo uma a original. Após revisão, pede-se que os trabalhos sejam enviados em disquete, devidamente acompanhados de uma cópia impressa da versão revisada.

Preparação de originais

3. Normas para enviar trabalhos, após revisão, em meio eletrônico; obedecer os seguintes requisitos:

a) podem ser utilizados disquetes MS-DOS compatíveis nos formatos 3 1/2" ou 5 1/4". Disquetes de Macintosh no formato 3 1/2" também serão aceitos. Elimine dos disquetes todos os arquivos não pertinentes ao artigo enviado. Escreva na etiqueta do disquete: título do artigo, nome do autor, nome do arquivo, editor de texto utilizado e nome dos arquivos acessórios (folhas de estilos, gráficos, tabelas etc);

b) envie artigos compatíveis com os seguintes processadores de texto: Word para Windows (versão 6.0 ou anterior), Word para Mac (versão 6.0 ou anterior), outros

formatos podem ser aceitos mediante consulta prévia. Nunca envie artigos em formato ASCII (só texto/"text only");

c) ao redigir o texto, o comando de retorno de linha ("Enter") deve ser utilizado exclusivamente no final dos parágrafos. Não adicione espaços extras ou "tabs" ao texto para obter recuo da primeira linha ou centralização de títulos na página. Tampouco retornos ("enters") adicionais para espaçar os parágrafos. Para obter esses efeitos, utilize apenas os comandos de formatação de parágrafo, disponíveis em todos os editores de texto acima;

d) podem ser incluídas tabelas, desde que montadas no próprio editor de texto. Observações e notas de rodapé devem ser, preferencialmente, colocadas após o final do artigo, devidamente numeradas e referenciadas;

e) ilustrações, tabelas e gráficos produzidos em outros programas e "importados" para inclusão no texto devem ser enviados em arquivos anexos, em formatos universais de fácil compatibilidade (TIFF, BMP, PICT, GIF etc). Evite formatos não-padronizados (EPS, WMF etc) e arquivos que só podem ser abertos por programas específicos. De qualquer forma, envie sempre uma cópia bem impressa do gráfico, tabela ou ilustração para eventual reprodução.

4. Os trabalhos devem ser redigidos preferencialmente em português, embora sejam também aceitos trabalhos em inglês e espanhol. A linguagem deve ser clara e precisa, e o texto conciso normalmente não ultrapassando 12 páginas digitadas para Artigos e 6 para Comunicações.

5. A seguinte seqüência deve ser observada:

a) título original e traduzido e nome dos autores em letras minúsculas. No rodapé, instituição onde foi realizado o trabalho, filiação dos autores, quando for o caso, órgão financiador e o endereço completo para correspondência, inclusive telefone, fax e e-mail;

b) resumo: máximo de 150 palavras para os artigos e 50 para as comunicações e relatos de casos. Deve ser informativo e não indicativo, apresentando o objetivo do trabalho, como foi realizado, os resultados alcançados e a conclusão. Não usar abreviaturas ou citações bibliográficas. Citar 4 ou 5 palavras-chave, que expressem com precisão o conteúdo do trabalho;

c) abstract: inserido logo após o resumo, deve ser a tradução fiel do mesmo, seguido pelas key-words;

d) introdução: clara, objetiva, contendo informações que justifiquem o trabalho, restringindo as citações ao necessário;

e) material e métodos: descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser referidos por citação;

f) resultados: sempre que necessário devem ser acompanhados por tabelas, figuras ou outras ilustrações, auto-explicativas. Texto e documentação devem ser complementares. Quando aplicáveis, os dados deverão ser submetidos à análise estatística. O conteúdo deve ser informativo, não interpretativo;

g) discussão: limitar aos resultados obtidos e conter somente as referências necessárias. O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas com base nos achados;

h) agradecimentos: limitados ao indispensável;

i) referências bibliográficas: digitadas em minúsculas, sem ponto entre as abreviaturas, em espaço duplo, numeradas e organizadas em ordem alfabética pelo último sobrenome do autor; citar todos os autores de cada referência. Quando houver mais de uma citação do mesmo autor, seguir a ordem cronológica. As citações devem ser referidas no texto pelos respectivos números, acima da palavra correspondente, sem vírgula e sem parênteses; na lista de referências, deve seguir o seguinte estilo e pontuação:

Artigos em periódicos (os títulos dos periódicos devem aparecer por extenso):

Coura JR, Conceição MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Baarbosa no diagnóstico da esquistossomose mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 8:153-158, 1974.

Livros:

Chandra RK, Newberne PM. Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions. Plenum, New York, 1977.

Capítulos de livros:

Fulton JD. Diagnosis of protozoal diseases. In: Gell PGH, Coombs RRA (ed) Clinical aspects of immunology, 2nd edition, Blackwell, Oxford, p.133-136, 1968.

Resumos de congressos:

Daher RH, Almeida Netto JC, Pereira LIA. Disfunção hepática na malária grave. Estudo de 161 casos. In: Resumos do XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília p.16, 1995 .

Teses:

Tavares W. Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*. Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1975.

Somente deverão ser citados os trabalhos publicados. Dados não publicados ou comunicações pessoais devem ser referidos no texto da seguinte forma: (AB Figueiredo: comunicação pessoal, 1980) e (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados).

6. Tabelas: numeradas em algarismos arábicos e dotadas de título descritivo conciso. Manter seu número ao mínimo necessário e lembrar que tabelas muito grandes são difíceis de serem lidas. Devem ser digitadas em espaço duplo em folhas separadas, sem linhas verticais e as unidades referidas no título de cada coluna. Todos os dados das tabelas, inclusive o título, devem ser em minúsculas, exceto as siglas.

7. Ilustrações: de boa qualidade e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. Além das fotografias, os gráficos, quadros etc. devem ser referidos no texto como Figuras. Anotar no verso com lápis o número da figura e o nome do autor e trabalho. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções em folha separada e em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário.

8. Comitê de ética: no trabalho de pesquisa envolvendo seres humanos, deverá constar o nome do Comitê de Ética que o aprovou.

9. Permissão dos autores: anexar carta com o ciente de todos os autores concordando com a publicação.

Conclusão Geral

O estudo de aspectos relacionados a biologia de insetos como o *Lutzomyia whitmani*, incriminado na transmissão da Leishmaniose Tegumentar, vem subsidiar estratégias de controle do vetor diminuindo a incidência de casos dessa doença no homem e em outros animais.

Além disso, isoladamente cada um desses fatores possuem sua contribuição individual. A determinação de parâmetros de manutenção de uma colônia em laboratório é importante, uma vez que, fornece espécimes para o desenvolvimento de estudos de naturezas diversas, como moleculares e imunológicos. Ainda, os fungos e ácaros podem constituir-se uma possível forma de controle biológico, pois interferem no desenvolvimento das formas imaturas.

Conhecer as fontes alimentares sanguíneas de insetos vetores significa determinar os prováveis reservatórios do parasita conhecendo todos os elos do processo de transmissão.

E por fim a determinação da capacidade vetorial de *L. whitmani* para espécies de *Leishmania* causadoras da LT, quando associados a aspectos entomológicos e epidemiológicos, nos leva a concluir que essa espécie é realmente uma das dispersoras desta doença.