

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FERNANDA DOS SANTOS ALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INSETICIDA E REPELÊNCIA SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
EM CÃES TRATADOS COM PERMETRINA 65% OU COM A COLEIRA
IMPREGNADA COM DELTAMETRINA 4%

BELO HORIZONTE

2014

FERNANDA DOS SANTOS ALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INSETICIDA E REPELÊNCIA SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
EM CÃES TRATADOS COM PERMETRINA 65% OU COM A COLEIRA
IMPREGNADA COM DELTAMETRINA 4%

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2014

Alves, Fernanda dos Santos, 1985-
A474a Avaliação dos efeitos e repelência sobre *Lutzomyia longipalpis* em cães tratados com permetrina 65% ou com a coleira impregnada com deltametrina 4% / Fernanda dos Santos Alves. – 2014.

100 p. : il.

Orientador: Roberto Baracat de Araújo

Co-orientadora: Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

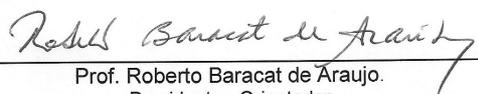
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

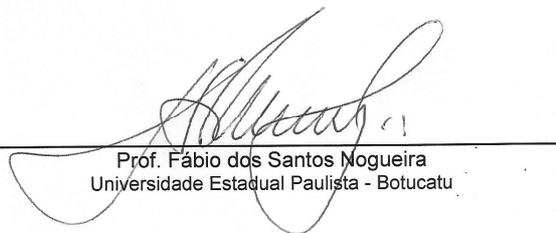
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Controle – Teses. 3. Psicodido – Teses. 4. Flebótomo – Teses. I. Araújo, Roberto Baracat de. II. Costa Val, Adriane Pimenta da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 08 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Roberto Baracat de Araujo.
Presidente - Orientador



Prof. Fábio dos Santos Nogueira
Universidade Estadual Paulista - Botucatu



Profª Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Escola de Veterinária - UFMG

“Those dreams are tied to a horse that will never tire...”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS	14
2.1 Hipóteses	14
2.2 Objetivos	15
2.2.1 Objetivos Gerais	15
2.3 Objetivo Específico	15
3 DESENVOLVIMENTO	16
CAPÍTULO 1: Literatura consultada	16
CAPÍTULO 2: Avaliação dos efeitos inseticida e repelência sobre <i>L. longipalpis</i> em cães tratados com permetrina 65% ou com a coleira impregnada com deltametrina 4%	27
CAPÍTULO 3: Avaliação dos efeitos repelência e inseticida sobre <i>Lutzomyia longipalpis</i> em cães utilizando a coleira impregnada com deltametrina 4%, submetidos ou não a banhos quinzenais	40
CAPÍTULO 4: Avaliação dos efeitos inseticida imediato e repelência da permetrina 65% e de sua associação com deltametrina 4% sobre flebotomíneos transmissores da leishmaniose visceral canina	67
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
6 ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	<i>Lutzomyia longipalpis</i> – macho. Observar os apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (seta).	19
Fig. 2	<i>Lutzomyia longipalpis</i> – fêmea.	19
Fig. 3	Larva de primeiro estágio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> eclodindo do ovo.	2
Fig. 4	Flebocontainer. A – Vista geral; B - Vista da tela fina por onde ocorre o contato entre o flebótomo e o cão.	31
Fig. 5	Gaiola para exposição dos cães aos flebótomos.	46
Fig. 6	Aspiração dos flebotomíneos vivos, com o cão ainda posicionado dentro da gaiola, através das mangas laterais.	47
Fig. 7	Fêmea de <i>L. longipalpis</i> não ingurgitada.	47
Fig. 8	Fêmea de <i>L. longipalpis</i> com discreto ingurgitamento com sangue	47
Fig. 9	Fêmea de <i>L. longipalpis</i> ingurgitada com sangue.	48
Fig. 10	Fêmea de <i>L. longipalpis</i> com marcante ingurgitamento com sangue.	48
Fig. 11	Fêmea de <i>L. longipalpis</i> com marcante ingurgitamento com sangue.	48
Fig. 12	Sequência de três fêmeas ingurgitadas (esquerda para direita) e uma não ingurgitada de sangue.	48

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 1	Número de flebótomos expostos e sua classificação no Grupo Controle (GC).....	32
Grafico 2	Número de flebótomos expostos e sua classificação no grupo tratado com Permetrina 65% (GP).....	33
Grafico 3	Número de flebótomos expostos e sua classificação no grupo tratado com a coleira impregnada com Deltametrina 4% (GD).....	34
Grafico 4	Comparação entre o grupo tratado com permetrina 65% (GP) e o grupo tratado com coleira impregnada com deltametrina 4% (GD).....	35
Grafico 5	Efeito inseticida em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G1.....	47
Grafico 6	Efeito repelência ao longo do tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G1.....	47
Grafico 7	Efeito inseticida ao longo do período, individualmente, em porcentagens (%), do G2.....	47
Grafico 8	Efeito repelência em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G2	47
Grafico 9	Médias do efeito repelência dos grupos, em porcentagem.....	48
Grafico 10	Médias do efeito inseticida dos grupos, em porcentagem.....	48
Gráfico 12	Média por grupo, por tempo, de fêmeas ingurgitadas e vivas.....	50
Gráfico 13	Médias por grupo, por tempo, de fêmeas ingurgitadas e vivas após avaliação através do Qui-quadrado.....	50
Gráfico 14	Comparação do efeito inseticida entre G1 e G2.....	51
Gráfico 15	Comparação do efeito repelência entre os grupos G1 e G2.....	52
Gráfico 16	Médias do hematócrito(%) dos animais do grupo, por tempo.....	53
Gráfico 17	Médias da contagem de hemácias(milhões /mm ³) dos animais, por tempo.....	54
Gráfico 18	Médias da hemoglobina (g/dl) dos animais, por tempo.....	54
Gráfico 19	Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fl) dos animais, por tempo.....	54
Gráfico 20	Médias da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%), por tempo.....	54
Gráfico 21	Médias da contagem de leucócitos (/mm ³) totais, por tempo.....	55
Gráfico 22	Médias da contagem dos neutrófilos bastonetes (/mm ³) dos animais, por tempo	55
Gráfico 23	Médias da contagem dos neutrófilos segmentados (/mm ³) dos animais, por tempo.....	55
Gráfico 24	Médias da contagem de eosinófilos (/mm ³) dos animais, por tempo.....	56
Gráfico 25	Médias da contagem dos linfócitos (/mm ³) dos animais, por tempo.....	56
Gráfico 26	Médias da contagem dos monócitos (/mm ³) dos animais, por tempo.....	56
Gráfico 27	Médias da contagem das plaquetas (/mm ³) dos animais, por tempo.....	57
Gráfico 28	Médias correspondentes às dosagens de ALT (mg/dL) dos animais, por tempo...	57
Gráfico 29	Médias correspondentes às dosagens de AST (mg/dL) dos animais, por tempo...	57
Gráfico 30	Médias correspondentes às dosagens de FA (mg/dL) dos animais, por tempo.....	57
Gráfico 31	Médias correspondentes às dosagens de proteínas totais (g/dL) dos animais, por tempo.....	58

Gráfico 32 Médias correspondentes às dosagens de albumina (g/dL) dos animais, por tempo.....	58
Gráfico 33 Médias correspondentes às dosagens de globulina (g/dL) dos animais, por tempo.....	58
Gráfico 34 Médias correspondentes às dosagens de ureia (mg/dL) dos animais, por tempo..	59
Gráfico 35 Médias correspondentes às dosagens de creatinina(mg/dL)dos animais, por tempo.....	59
Gráfico 36 Médias(%) relativas aos efeitos inseticida e repelência.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LV	LEISHMANIOSE VISCERAL
LVC	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
VCM	VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO
CHCM	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA
ALT	ALANINO-AMINOTRANSFERASE
AST	ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE
FA	FOSFATASE ALCALINA

Resumo

A leishmaniose visceral canina, zoonose de grande importância em países como América do Sul, Europa e Ásia, é uma doença veterinária ofuscada pelo fato de cães serem os principais reservatórios urbanos. As tentativas de controle são direcionadas para a redução do risco de infecção humana e não visando a proteção individual do cão de uma doença invariavelmente fatal. O extermínio de cães, além de eticamente inaceitável, não produziu redução da incidência da doença em humanos por diversos motivos, dentre eles falhas no diagnóstico, extermínio e reposição de animais por outros susceptíveis. Um método viável para a proteção dos cães é a utilização de produtos com efeitos repelentes e inseticidas. Dentre as opções estão a permetrina 65% *pour on* e a coleira impregnada com deltametrina 4%, ambos piretroides sintéticos que atuam em flebotomos como o *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor no Brasil. Visando verificar a eficácia desses produtos em proporcionar a proteção individual de cães através de dois principais efeitos, o de repelência e o inseticida, a permetrina 65% e a coleira impregnada com deltametrina 4% foram avaliadas através da exposição de cães que as utilizavam a flebotomos obtidos de uma colônia fechada, posteriormente classificados em vivos ou mortos e em machos, fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas. Percebeu-se, comparando a permetrina 65% a coleira impregnada com deltametrina 4%, que o efeito inseticida foi melhor no grupo que utilizava a coleira impregnada (2%) e não a permetrina (1%). O inverso foi observado no efeito repelência, quando a permetrina demonstrou melhor resultado (40%) que a coleira impregnada com deltametrina 4% (33%), com diferença estatística. Quando comparados os grupos banhados quinzenalmente com o grupo não banhado, aos 21 dias, o efeito inseticida foi mais significativo no grupo não banhado (9%) em comparação ao grupo banhado (7%). Já aos 60 dias, o grupo submetido a banhos apresentou melhores resultados em relação ao sem banho (51% e 2%, respectivamente). Nos demais momentos não foram observadas diferenças significativas. Já para o efeito repelência, foi percebida diferença estatisticamente significativa apenas aos 7 dias e aos 21 dias, quando o grupo com banho apresentou melhores resultados (49% e 56%, respectivamente). Quanto à capacidade da coleira impregnada com deltametrina em causar a morte de fêmeas ingurgitadas, aos 7 e 21 dias, o grupo não banhado apresentou maior porcentagem de fêmeas vivas e ingurgitadas (16% e 10%, respectivamente). A permetrina 65% demonstrou eficácia crescente no efeito inseticida, com diferença estatisticamente significativa entre o momento em que os cães não utilizavam o produto (3,6%) e aos 60 dias (17,1%) e entre o momento inicial (3,6%) e aos 90 dias (20,8%). Já para repelência, ocorreu diferença estatística significativa apenas quando comparados o momento inicial (29,1%) e após 60 dias (37%). A associação da permetrina com a coleira impregnada com deltametrina não apresentou aumento significativo na mortalidade e repelência dos flebotomos.

Palavras-chave: Leishmaniose, Psychodidae, prevenção e controle, doenças do cão

Abstract

Canine visceral leishmaniasis, a zoonosis of major importance in countries in South America, Europe and Asia, is an animal disease overshadowed by the fact that dogs are the main urban reservoirs. Attempts to control are aimed at reducing the risk of human infection rather than for dog's protection from a invariably fatal disease. Dog culling, as well as ethically unacceptable, did not produce reduction in the incidence of the human disease for several reasons, including failures in diagnosing, culling and the replacement by other susceptible animals. A viable method for the protection of dogs are the products with repellent and insecticide effects. Among the options are the 65 % permethrin pour on and 4 % deltamethrin-impregnated collar, both synthetic pyrethroids that are able to repel and kill the main vector in Brazil, the *Lutzomyia longipalpis*. In order to verify the effectiveness of these products to provide protection to dogs through two main effects, the repellent and insecticide, permethrin 65 % and deltamethrin-impregnated collar were evaluated by exposing dogs treated with one of them or both to sandflies obtained a closed colony, which were later classified as alive or dead, and in males and in not engorged or engorged females. It was realized by comparing the 65% permethrin with deltamethrin-impregnated collar that the insecticidal effect was better in the group that used the collar (2%) than in group treated only with permethrin (1%). The opposite was observed in the repellency effect when permethrin showed better results (40%) than the deltamethrin impregnated collar (33%), with statistical difference. Comparing the bathed group to the one that was not bathed during the research at 21 days, the insecticidal effect was more significant in group that was not bathed (9 %) compared to the bathed group (7%). At 60 days, the group undergoing baths showed better results compared to without bath (51% and 2%, respectively). In other moments, no significant differences were observed. As for the repellency effect was noticed statistically significant difference only at 7 days and at 21 days, when the group with bath yielded better results (49% and 56%, respectively) difference. Regarding the ability of the deltamethrin-impregnated collar in causing the death of engorged, at 7 and 21 days, the group that was not bathed showed higher percentage of females alive and engorged (16% and 10%, respectively). Permethrin 65 % demonstrated increased efficiency in insecticidal effect, with statistically significant difference between the time that the dogs did not use the product (3,6%) and after 60 days (17,1%) and between the initial time (3,6%) and at 90 days (20,8%). As for repellency, there were significant statistical difference only between the initial moment (29,1%) and after 60 days (37 %) compared. The combination of permethrin.

Key-words: leishmaniasis, Psychodidae prevention and control, dog diseases

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos membros do gênero *Leishmania*, classe Kinetoplasta e família Trypanosomatidae (GRAMICCIA, 2011). Dentre as 15 espécies reconhecidas que infectam seres humanos, treze possuem natureza zoonótica (GRAMICCIA E GRADONI, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, com estimativa de 12 milhões de pessoas infectadas e de 1,5 a 2 milhões de novas infecções ao ano, além de ser endêmica em 88 países (WHO, 2009).

As infecções em cães são de grande importância na saúde pública por serem considerados o principal reservatório da leishmaniose visceral zoonótica, causada por *Leishmania infantum* (MAURICIO et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; BANETH, 2006). Completando o ciclo epidemiológico da doença os vetores são flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (SHARMA e SINGH, 2008; GRAMICCIA, 2011).

Estratégias de controle convencionais contra a leishmaniose visceral (LV) incluem o uso de inseticidas com poder residual no entorno das casas (cipermetrina ou deltametrina), o extermínio de cães

positivos para anticorpos *Leishmania*-específicos, detecção e tratamento de casos humanos e educação da população sobre a prevenção (GIFFONI et al., 2002; BRASIL, 2006; ANTONIOU et al., 2009). Além disso, o Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral cita como medidas preventivas o controle da população de cães errantes e o saneamento ambiental (BRASIL, 2006). Apesar de o extermínio compulsório de cães soro reagentes para LV no Brasil ocorrer desde 1963 (Decreto n. 51.838, do Ministério da Saúde do Brasil, 14 de março de 1963) a eficácia e ética deste método tem sido frequentemente questionadas (MOREIRA et al., 2004).

Formulações tópicas com ação residual longa são desejáveis para controle público sustentável. Atualmente, as medidas preventivas são baseadas principalmente no uso de produtos contendo piretroides sintéticos, como a permetrina ou a deltametrina (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Dentre essas opções encontra-se coleiras para cães, impregnadas com deltametrina, em uma concentração de 40mg/g (KILLICK-KENDRICK et al., 1997) e a permetrina *pour-on* 65% (MOLINA et al., 2012)

O efeito epidemiológico de tratamentos com inseticidas tópicos em cães irá

depende não apenas de uma redução no número de flebotomos alimentando-se nos cães, dito efeito anti-alimentação ou de repelência, mas também na redução da sobrevivência daqueles que se alimentam, denominada mortalidade, assim reduzindo sua possibilidade de transmitir a leishmaniose (DAVID et al., 2001; MOLINA et al., 2001; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002; FRANC E BOUSHIRA, 2009). No Brasil, observou-se que o uso da coleira por todos os cães na cidade de Araçatuba (São Paulo) associado às outras medidas de controle foi capaz de reduzir a prevalência da doença nos cães, embora não seja possível associar tal evento ao uso da coleira já que outras medidas (extermínio de cães sororreagentes, por exemplo) não foram interrompidas (CAMARGO-NEVES, 2004)

São escassas, na literatura, dados sobre a eficácia individual da coleira impregnada com deltametrina 4% usadas em cães não banhados ou naqueles banhados com frequência, embora relata-se que uma redução de 8% na eficiência da coleira impregnada com deltametrina a cada exposição a xampus ou químicos presentes em piscinas, apesar de ser a prova d'água

(POLONKO, Comunicação Pessoal, 2012). Hoje em dia a maioria das pessoas considera seus animais como parte da família, portanto, querer dar a eles o melhor é normal. Suas necessidades básicas incluem não apenas alimento e água fresca, abrigo, exercícios e enriquecimento de seu ambiente mas também os cuidados com a pelagem e a higiene, dentre eles o banho (AUGUST, 2011). Em pesquisa realizada em um município do Espírito Santo, 55% dos proprietários dão banho em seus cães semanalmente e pelo menos 38% realizam banhos quinzenais (LOSS et al., 2012).

Desta forma, no presente estudo procurou-se determinar os efeitos repelência e inseticida da coleira impregnada com deltametrina 4% e a permetrina 65% em cães, em três experimentos distintos, sendo eles: o uso da permetrina 65% ou da coleira impregnada com deltametrina em cães, o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% em cães submetidos a banhos quinzenais e em cães não banhados por 4 meses e, por fim, os efeitos do uso da permetrina 65% em aplicações consecutivas, seguida de sua associação com a coleira impregnada com deltametrina 4%.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

Ocorre redução da eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4% após exposição ao banho.

O uso da coleira impregnada com deltametrina a 4% ou da permetrina 65%

spot on possuem eficácia semelhante para proteção individual do cão.

O uso conjunto de permetrina 65% *spot on* e da coleira impregnada com deltametrina a 4% proporciona melhor proteção individual do cão.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar experimentalmente os efeitos inseticida imediato, repelência e mortalidade da coleira impregnada com deltametrina 4% em cães banhados quinzenalmente e em cães não banhados, por 4 meses.

- Avaliar experimentalmente os efeitos inseticida e repelência da solução de permetrina 65% *pouon*

e da coleira impregnada com deltametrina a 4%, comparando a eficácia individual dos piretroides.

- Avaliar experimentalmente os o uso simultâneo de permetrina *pouon* 65% e da coleira impregnada com deltametrina a 4% por 4 meses.

2.3 Objetivo Específico

- Avaliar alterações hematológicas (hemácias, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, leucócitos totais, bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, plaquetas) e bioquímicas (ALT, AST, FA, ureia,

creatinina, proteínas totais, albuminas, globulinas) causadas pelo uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%, em intervalos quinzenais por todo o período do experimento.

3 DESENVOLVIMENTO

CAPÍTULO 1: Literatura consultada

1. Leishmaniose Visceral Canina

A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e é uma zoonose potencialmente fatal em regiões da Europa, Ásia e América (BANETH et al., 2008). A *Leishmania* é um protozoário dixênico, pertencente à ordem Kinetoplastida (CIAMARELLA e CORONA, 2003), parasita obrigatório dos macrófagos de mamíferos (VULPIANI et al., 2011).

O cão doméstico é um importante reservatório da doença (REITHINGERET al., 2004; BANETH et al., 2008; VERÇOSA et al., 2008), transmitida por flebótomos do gênero *Lutzomyia* (Fig.1) (VERÇOSA et al., 2008). A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é o principal vetor urbano da leishmaniose no Brasil (SANT'ANNA et al., 2008; FREITAS et al., 2012), embora o *L. cruzi* também seja capaz de transmitir promastigotas infectantes (FREITAS et al., 2012).

A LVC apresenta manifestações clínicas variáveis (CIAMARELLA e CORONA, 2003; FREITAS et al., 2012), sendo os principais sinais clínicos a caquexia, ceratoconjuntivite, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, palidez de membranas mucosas, dermatite esfoliativa,

ulcerações, perda de peso, alopecia peri-orbital, alopecia, epistaxe, onicogribose, anorexia, uveíte, panofalmitite, nódulos não ulcerados, artropatias, glomerulonefrite (CIAMARELLA e CORONA, 2003). Poliúria e polidipsia, febre, êmese, dermatite papular, dermatite pustular, ulceração muco-cutânea ou mucosa, desordens vasculares, desordens neurológicas, miosite atrofica dos músculos mastigatórios também são citados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Blavieret al. (2001) cita algumas formas atípicas de apresentação clínica da LVC, dentre elas a colite crônica, alterações hemostáticas e desordens dos sistemas cardiovascular, respiratório e músculo-esquelético. As alterações laboratoriais mais comuns encontradas em animais infectados incluem anemia leve a moderada não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, hemostasia secundária e fibrinólise alteradas, proteinúria leve a moderada, azotemia, elevação de enzimas hepáticas, hiperglobulinemia (policlonal beta e/ou gamaglobulinemia), hipoalbuminemia, relação albumina/globulina reduzida (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O diagnóstico laboratorial da LVC ainda é um desafio apesar dos progressos realizados através do desenvolvimento de diversos métodos diretos e indiretos. Um teste diagnóstico efetivo, além de ser capaz de confirmar a doença em cães suspeitos e em cães assintomáticos, deve possuir alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (MAIA e CAMPINO, 2008). Os principais testes diagnósticos por meio direto são a microscopia, histopatologia, imuno-histoquímica,

cultura, xenodiagnóstico, reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR-*real time* e isolamento do parasito em animais de laboratório. Entre os meios indiretos estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação direta, ELISA-recombinante, testes rápidos de imunocromatografia, *Western blotting* e citometria de fluxo (MAIA e CAMPINO, 2008).

1.1 – Estratégias de controle da LVC no Brasil

Entre as estratégias convencionais de controle da LVC estão a aspersão de inseticidas com poder residual no entorno das casa, por exemplo, deltametrina ou cipermetrina, a eliminação de cães sororeagentes para anticorpos anti-*Leishmania*, diagnóstico e tratamento de casos humanos e educação sanitária da população a respeito da prevenção e da doença. (GIFFONI et al., 2002; BRASIL, 2006; ANTONIOU et al., 2009). O Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral também cita como medidas preventivas o controle populacional de cães errantes e o saneamento ambiental (BRASIL, 2006). Apesar de o extermínio compulsório de cães soropositivos para LV no Brasil ocorrer desde 1963 (Decreto n. 51.838, do Ministério da Saúde do Brasil,

14 de março de 1963) a eficácia e ética deste método tem sido frequentemente questionadas (MOREIRA et al., 2004). As falhas deste método são diversas: uma considerável proporção de cães soropositivos não é exterminada pois o diagnóstico não é absolutamente sensível ou por seus proprietários não aceitarem; os cães soro positivos são identificados apenas muito tempo após sua infecção e, uma vez que as pesquisas são infrequentes, o intervalo entre o diagnóstico e a eutanásia é longo, sendo de até 6 meses. Por último, proprietários rapidamente substituem os cães por filhotes susceptíveis à infecção (LACERDA, 1994). No Brasil, a portaria interministerial 1426/2008 proíbe o tratamento de cães com leishmaniose com produtos utilizados no tratamento de

humanos ou com produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 2008 (MAPA, 2012). O Conselho Federal de Minas Gerais, em dezembro de 2013, esclareceu que o

1.2 – Importância da LVC

As infecções de cães por *Leishmania infantum* possuem grande importância para a saúde pública, uma vez que os cães são considerados reservatórios da doença (REITHINGER et al., 2001; COURTENAY et al., 2002; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002). Além disso, os

tratamento da LVC continua sendo proibido e a portaria permaneceu em vigor, com indicação de eutanásia em todas as situações (CFMV, 2013).

cães geralmente possuem elevada prevalência de infecção e infectividade, infecções de longa duração e são comuns no ambiente peridoméstico, no qual a maior parte da transmissão da leishmaniose visceral (LV) ocorre (QUINNEL e COURTENAY, 2009).

2. O vetor *Lutzomyia longipalpis*

2.1 – Características gerais

Os flebotômíneos são dípteros psicodídeos e, como tais, são insetos de pequeno porte (2 a 3mm), apresentando o corpo com intensa cobertura pilosa (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Sua cor varia entre o amarronzado, o acinzentado ou amarelado (RUTLEDGE e GUPTA, 2002), embora outros autores os classifiquem como insetos de cor variando entre a quase branca a quase negra (KILLICK-KENDRICK, 1999). Quando em repouso, os flebotomos apresentam suas asas em um formato característico de “V” (CLABORN, 2010).

Apresentam dimorfismo sexual tanto na morfologia como no comportamento

alimentar, que se expressa na hematofagia exclusiva da fêmea. Morfologicamente, macho e fêmea distinguem-se em suas probóscidas, mais curta nele. Na fêmea é longa e adaptada para picar e sugar. Além disso, apenas a fêmea apresenta uma estrutura denominada cibário, localizada em na região ventral, internamente, na cabeça. Os últimos segmentos abdominais também permitem a distinção entre os sexos: no macho, está presente um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (Fig.1) e, na fêmea, os segmentos menores e discretos dispõem-se de modo a conferir a ela um aspecto arredondado à sua genitália (Fig.2)

(BRAZIL e BRAZIL, 2003).



Fig. 1 – *Lutzomyia longipalpis* – macho. Observar os apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (seta).



Fig. 2 – *Lutzomyia longipalpis* – fêmea.

Os adultos, machos e fêmeas, necessitam de carboidratos como fonte de energia para realização de atividades como voo, acasalamento e postura, bem como para garantir a sobrevivência. Os carboidratos também possuem um importante papel no desenvolvimento e infectividade da *Leishmania*, agindo como bacteriostáticos e servindo de fonte de energia para os

parasitas se multiplicarem mais facilmente no trato digestivo dos flebótomos (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

O repasto sanguíneo das fêmeas pode ocorrer 24 horas após a emergência, porém, em observações realizadas em laboratório, percebeu-se que um número maior de fêmeas inicia o repasto após 48 horas da emergência. Assume-se que os flebótomos

possuem concordância gonotrófica, ou seja, cada oviposição é precedida por um repasto sanguíneo, como observado em outros dípteros hematófagos (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Entretanto, existem divergências a respeito do número de repastos sanguíneos necessários durante um ciclo: múltiplos repastos sanguíneos são realizados entre cada ciclo gonotrófico da espécie *L. longipalpis* (ELNAIEN et al., 1992). A necessidade de uma segunda alimentação sanguínea em fêmeas grávidas poderia estar relacionada à manutenção do equilíbrio hídrico em virtude de fatores climáticos (alta temperatura, baixa umidade) que afetariam sua capacidade de realizar a oviposição. Esse fenômeno assume grande importância epidemiológica por ampliar o poder de transmissão de micro-organismos por esses insetos (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Em um estudo de Afonso et al. (2011), fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram de mais de uma fonte foram detectadas e entre as 17 combinações de sangue encontradas, as mais frequentes foram: cão e ave; cão e ovinos; cão e

equino; cão e gambá; ovino e felino e, por fim, caprino + ovino + equino. No estudo de Oliveira et al. (2008), a combinação mais encontrada foi humano + suíno e os autores relataram baixa atratividade dos cães aos flebótomos, embora todos os domicílios possuíssem caninos. A taxa de repasto sanguíneo em cães foi de 8,9% nesse estudo.

Muito susceptíveis à desidratação, os flebótomos apresentam em sua maioria comportamento noturno (CLABORN, 2010) ou crepusculares, permanecendo durante o dia em locais protegidos de grandes alterações ambientais (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Procuram abrigo em buracos de animais, grutas, cavernas, troncos de árvores, pedras e outros habitats protegidos, incluindo habitações humana (CLABORN, 2003). De modo geral a distância coberta por seu voo está em torno de 300 metros, restringindo o adulto às proximidades do local de seu desenvolvimento larval (CLABORN, 2003).

2.2 – Ciclo de vida

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto, com duração variável de acordo com a espécie (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

O tempo estimado entre o repasto sanguíneo e a oviposição depende da espécie, velocidade de digestão e temperatura ambiente. Em condições laboratoriais, o período varia de 4 a 8 dias

(KILLICK-KENDRICK, 1999). O número de ovos postos por uma única fêmea, em uma oviposição, pode variar de 40 a 70, dependendo da espécie, tamanho, repasto sanguíneo e outros fatores (YOUNG e DUNCAN, 1994). Para a espécie *L. longipalpis* relata-se um número de 24 a 52 ovos por fêmea, ocorrendo normalmente no quinto dia após o repasto sanguíneo (SOARES e TURCO, 2003). Os ovos são depositados em um ambiente terrestre adequado que, em geral, são úmidos, relativamente quentes (CLABORN, 2003) e possuem matéria orgânica disponível para alimentação das larvas ao eclodirem (KILLICK-KENDRICK, 1999). Inicialmente os ovos são brancos ou cinzas, mas usualmente tornam-se marrom escuro ou preto após algumas horas da oviposição (CLABORN, 2003). Possuem forma elipsoide ou ovoide e medem de 0,3 a 0,5mm de comprimento. O período até a

eclosão das larvas é dependente da temperatura ambiente, mas, em média, varia de 6 a 17 dias (CLABORN, 2010), embora outros autores citem períodos diferentes: 7 a 10 dias (KILLICK-KENDRICK, 1999) e após 10 dias (YOUNG e DUNCAN, 1994).

As larvas são pequenas e de aspecto vermiforme, brancas, e, logo após a eclosão alimentam-se das cascas dos ovos, dos corpos dos adultos mortos e de outras matérias orgânicas disponíveis (Fig.3) (BRAZIL e BRAZIL, 2003). São quatro estádios larvares, que variam de comprimento de 0,55mm (primeiro estágio) a 3,2mm (quarto estágio). Movem-se apenas uma pequena distância do local de eclosão (CLABORN, 2010). O tempo total de desenvolvimento das larvas pode ser tão curto quando 18 dias, mas pode prolongar-se por meses durante condições climáticas frias e secas (YOUNG e DUNCAN, 1994).



Fig. 3 – Larva de primeiro estágio de *Lutzomyia longipalpis* eclodindo do ovo. Fonte: Leite e Williams, 1997. Acesso: [<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v92n2/3179.pdf>]

Antes de se transformar em pupa, a larva madura cessa a alimentação e procura um local, geralmente mais seco que o atual, para tornar-se pupa. A pupa adere-se a um objeto como folha seca ou pedra (YOUNG e DUNCAN, 1994), com auxílio da exúvia do último estágio, afixada em sua região caudal (RUTLEDGE e GUPTA, 2002). Usualmente este estágio dura de 7 a 12 dias, sendo os machos primeiro a emergirem (YOUNG e DUNCAN, 1994), embora Killick-Kendrick (1999) relate a duração de 10 dias.

Após 24 horas da emergência, os machos rotacionam sua genitália externa em 180° e tornam-se sexualmente maduros (YOUNG e DUNCAN, 1994; BRAZIL e BRAZIL, 2003) e mantêm-se pouco ativos. É praticamente desconhecida a longevidade

dos adultos em condições naturais, no entanto, observações obtidas em colônias de laboratório indicam machos e fêmeas podem sobreviver entre 20 e 30 dias (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Também são poucas as observações relativas ao acasalamento em condições naturais. Em laboratório, o *L. longipalpis* copula com bastante frequência em gaiolas ou câmaras de observação. A corte nupcial nesta espécie, realizada pelo macho, consiste em movimentos circulatorios constantes e pelo bater de asas, atraindo as fêmeas. Após alguns segundos o macho de põe em sentido contrário ao da fêmea e realiza a apreensão das extremidades posteriores das fêmeas pelos apêndices genitais masculinos.

2.3 – Controle de flebotomíneos

As limitações para prevenção da leishmaniose restringem as opções para seu controle. Estratégias primárias incluem o extermínio dos reservatórios e alguma forma de controle do vetor, incluindo barreiras à alimentação dos flebotomos (CLABORN, 2010).

Baseando-se em modelos matemáticos, o controle dos flebotomos através de inseticidas representa um modo mais

efetivo de reduzir a transmissão de *L. infantum* que o extermínio de cães infectados (DYE, 1996). Em um estudo de Reithinger et al. (2004), comparando a efetividade da coleira impregnada com deltametrina ao método de exterminar os cães infectados, os autores concluíram que a efetividade da coleira é igualmente sensível ao percentual de cães em uso, do grau de proteção ofertada e da taxa de perda

do efeito inseticida. Enquanto a efetividade de ambas as intervenções reduz com o aumento da endemidade, o impacto da coleira impregnada com deltametrina é pouco afetado por mudanças na prevalência de cães infectados. O impacto do extermínio é mais sensível à variação na endemidade, indicando que um programa que extermina 50% dos cães infectados uma vez ao ano, seria mais eficiente que a

2.3.1 – Métodos de controle disponíveis

O controle da leishmaniose visceral têm se apoiado na detecção e tratamento de casos humanos, aspersão de inseticida residual e

Aspersão de inseticida residual em casas e abrigos de animais

O tratamento residual de paredes de habitações humanas e de abrigos de animais depende da disponibilidade de infraestrutura pública adequada, incluindo suprimento de inseticidas, equipamento de aspersão e pessoal treinado. Idealmente tais pessoas deveriam ser treinadas em aplicação de inseticidas, técnicas de monitoramento, interpretação de dados amostrais, bem como técnicas de segurança (ALEXANDER e MAROLI, 2003). Os inseticidas utilizados incluem produtos como organoclorados, organofosforados (malation), carbamatos (propraxur) e piretroides sintéticos (permetrina e

coleira onde a prevalência é menor que 30% (REITHINGER et al., 2004).

A interrupção do ciclo através do controle do vetor pode ser uma solução mais barata e prática que o tratamento. O aumento do conhecimento sobre alternativas disponíveis para o controle poderia levar a medidas preventivas sendo empreendidas em mais focos de leishmaniose (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

remoção da fonte de infecção através do extermínio dos cães infectados (GRADONI et al., 2008).

deltametrina). Por diversos meses o inseticida matará todos os insetos susceptíveis que entrarem em contato com essas superfícies. Este método previne a transmissão de LV através da redução da sobrevivência dos flebótomos (SHARMA e SINGH, 2008). Além disso, uma vez que a aspersão limita-se ao ambiente intra e peridomiciliar, os objetivos da aspersão são reduzir as taxas de picada dentro e ao redor dos domicílios ao invés de reduzir a população de flebotomíneos, portanto, será mais efetivo contra insetos intra-domiciliares (QUINNEL e COURTENAY, 2009).

Controle de flebotomíneos em ambientes silváticos

Em comunidade em que a transmissão de *Leishmania* ocorre dentro e ao redor de casas, mas os flebótomos reproduzem-se e descansam nas vegetações ao redor, a aspersão de inseticida como barreira pode ser alternativa à aspersão intra ou peridomiciliar. Esta técnica envolve o tratamento de troncos de árvores e

vegetação dentro de um raio pré-determinado das habitações humanas. As limitações incluem a dificuldade em alcançar cobertura adequada com inseticidas, resistência reduzida dos compostos e perigos à espécies que não são o alvo do controle (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

Utilização de telas mosquiteiras tratadas com inseticidas

Avantagem da utilização das telas como parte de programa de controle da leishmaniose é que os próprios membros da comunidade poderiam tratar, eles próprios, as telas, sendo elas fabricadas localmente ou providenciadas por autoridades sanitárias. Apesar dos piretroides usados para tratamento de telas mosquiteiras sejam relativamente seguros, sua incorporação em

programas de controle deve ainda incluir a supervisão ou treinamento dos usuários através das autoridades locais, para garantir que a impregnação seja realizada regularmente e que o inseticida não esteja sendo substituído por outros pesticidas mais perigosos (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

Tratamento inseticida dos locais de descanso e reprodução dos flebotomíneos

Em áreas abertas em que são conhecidos os locais de descanso e reprodução de flebótomos, o tratamento com inseticida ou

a destruição destes micro-habitats são formas mais focadas no controle da doença (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

Repelentes químicos

Em áreas em que a transmissão da leishmaniose é extradomiciliar e é considerada doença ocupacional, o uso de repelentes de insetos ou roupas para proteção podem ser as únicas medidas preventivas disponíveis. O uso de roupas

protetoras pode ser impraticável nos trópicos ou de custo muito elevado, enquanto os repelentes são relativamente baratos, embora possam ser potencialmente maléficis após uso prolongado. Inseticidas ou repelentes aplicados às roupas ao invés

da pele oferecem uma alternativa para proteção individual. No entanto, alguns estudos realizados concluíram que este

Inseticidas de uso tópico em cães

Apesar de algumas espécies selvagens possam estar envolvidas na epidemiologia da LV, os cães domésticos parecem ser o principal hospedeiro reservatório de *L. infantum* ao redor do mundo. Muito do foco do controle da LV está nestes animais nos dias atuais. Uma alternativa potencialmente viável para a proteção dos cães seria a utilização de uma coleira impregnada com inseticidas, por exemplo, a deltametrina (ALEXANDER e MAROLI, 2003), entretanto, o alto custo das coleiras pode ser um impedimento para países menos desenvolvidos (QUINNEL e COURTENAY, 2009). Inseticidas tópicos *pouron* geralmente requerem administrações mensais, o que é

2.3.2 – O papel da comunidade

Educação em saúde para o controle da LV é de grande importância. Por exemplo, a simples erradicação de todos os possíveis locais de repouso e criadouros de uma localidade pela população pode resultar em uma redução significativa da incidência da doença (KISHORE et al., 2006).

Informar a população a respeito dos principais meios de controle da LV,

método pode ser impraticável, após resultados pouco satisfatórios (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

logisticamente difícil para um programa de controle nacional (QUINNEL e COURTENAY, 2009).

Dentre os métodos citados, a aplicação do inseticida em forma de ‘*spray*’ em casas ou abrigos de animais é provavelmente o mais útil e mais utilizado (CLABORN, 2010).

Entretanto, programas de controle de LV existem por mais de 50 anos, com eficácia limitada e variável. As limitações operacionais e teóricas no controle atual baseado no extermínio de cães e aspersão de inseticidas nos domicílios, causando o questionamento a respeito de sua efetividade (QUINNEL e COURTENAY, 2009).

incluindo os meios de proteção individual, deveriam ser atividades realizadas por agentes de saúde adequadamente treinados. Entre as medidas de proteção individual, citam-se o uso de redes que impeçam a passagem do flebótomo, telas para portas e janelas, evitar atividades externas ao entardecer e à noite, dentre outras. As medidas educacionais deveriam ser

permanentes e apoiadas por associações de bairro e líderes comunitários (RIBEIRO et al., 2013).

Discussões a respeito de posse responsável, bem estar animal e aspectos de prevenção

2.3.3 -A proteção individual do cão

A importância da LV como um problema veterinário é ofuscado pelo fato de que cães são reservatórios de *L. infantum*, causador da LV em humanos. Portanto, as tentativas de controle da doença canina são direcionadas à redução do risco de infecção para o homem, ao invés de simplesmente proteger o cão (KILLICK-KENDRICK et al., 1997) de uma doença fatal (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Cães são animais

da LV em cães e humanos deveriam ser realizadas em visitas domiciliares, escolas públicas ou privadas (RIBEIRO et al., 2013).

de companhia comuns e a saúde destes animais é grande preocupação para seus proprietários (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Uma das medidas de proteção individual do cão é o tratamento com produtos repelentes (FERROGLIO et al., 2008) e, no Brasil, sugere-se que a vacinação contra LV seja realizada através de campanhas públicas, tal como é feito com a raiva (RIBEIRO et al., 2013).

3 – Piretrinas e piretroides

3.1- Características gerais

Piretrinas são compostos inseticidas obtidos das flores da planta *Tanacetum cinerariaefolium*, também conhecida como *Chrysanthemum cinerariaefolium* ou *Pyrethrum cinerariaefolium* (ENSLEY, 2012).

Piretrinas e piretroides são efetivos contra uma variedade de insetos tidos como pragas em animais de companhia e animais de fazenda, sendo usado também em fazendas, em domicílios e jardins, além de possuírem muitas aplicações na saúde humana devido à segurança destes compostos (ENSLEY,

2012). São separados em dois grupos: grupo I, que não contém o grupo ciano, e em grupo II, que contém o grupo alfa-ciano (WISMER e MEANS, 2012).

Causam hiperexcitabilidade com muito pouca citotoxicidade. Os alvos moleculares destes compostos são similares em mamíferos e insetos, incluindo canais de voltagem dependentes de sódio, canais de cloreto e cálcio, canais de cloreto dependentes de GABA, receptores nicotínicos, despolarização de membranas e em junções intercelulares. Os mamíferos

são mais resistentes que os insetos por possuírem um “*clearance*” metabólico mais rápido, temperaturas corporais mais altas e menor afinidade por piretrinas e piretroides (ENSLEY, 2012).

Piretroides são lipofílicos e se distribuirão em tecidos com elevado conteúdo lipídico como o tecido adiposo, fígado, rins e leite

3.2 – Toxicidade e tratamento

Cães, gatos e grandes animais possuem sinais clínicos similares para compostos do tipo I (por exemplo, a permetrina) e tipo II (por exemplo, a deltametrina) (ENSLEY, 2012). Os sinais clínicos incluem salivação, vômitos, tremores musculares, dispneia, ataxia, anorexia, hipo ou hipertermia, mas raramente leva à morte (GFELLER e MESSONIER, 2006).

(ENSLEY, 2012; WISNER e MEANS, 2012). Modulam a cinética dos canais retardando o fechamento dos canais de cálcio. Piretroides tipo II causam efeito mais longo que piretroides e piretrinas do tipo I, portanto, são considerados mais tóxicos que os do tipo I (WISNER e MEANS, 2012).

Não existe um antídoto específico para a toxicidade por piretroides, portanto, o tratamento é sintomático (ENSLEY, 2012). O principal tratamento para exposição dérmica é o banho do animal com sabonete neutro e água (GFELLER e MESSONIER, 2006; ENSLEY, 2012). A manutenção da temperatura corpórea é importante, uma vez que a toxicidade é aumentada na hipotermia (GFELLER e MESSONIER, 2006).

CAPÍTULO 2: Avaliação dos efeitos inseticida e repelência sobre *L. longipalpis* em cães tratados com permetrina 65% ou com a coleira impregnada com deltametrina 4%

1. Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos membros do gênero *Leishmania*, classe Kinetoplasta e família Trypanosomatidae (GRAMICCIA, 2011). Dentre as 15 espécies reconhecidas que infectam seres humanos, 13 possuem natureza zoonótica (GRAMICCIA e GRADONI, 2005). As infecções em cães

são de grande importância na saúde pública, uma vez que são o reservatório da leishmaniose visceral (LV) zoonótica, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo *L. chagasi*) (MAURICIO et al, 2001; REITHINGER et al, 2001; BANETH, 2006), sendo os vetores os flebotomíneos do gênero

Lutzomyia no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (SHARMA e SINGH, 2008; GRAMICCIA, 2011).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, ou seja, passam pela fase de ovo, quatro estádios de larvas, pupa e adultos; a duração de cada estádio, porém, depende da espécie, da condição climática e da alimentação disponível. São encontrados em quase todas as regiões faunísticas do mundo, mas são mais abundantes na região neotropical (SHERLOCK, 2003). São insetos voadores pequenos, de 2 – 3 mm de comprimento, corpo recoberto por pelos e silenciosos, encontrados no entorno de habitações humanas e que apresentam maior atividade no amanhecer e à noite (SHARMA e SINGH, 2008), embora segundo Brazil e Brazil (2003), o início de seu período de atividade ocorre durante à tarde ou à noite. Os flebotomíneos apresentam concordância gonotrófica, ou seja, a oviposição é precedida por um repasto sanguíneo (BRAZIL e BRAZIL, 2003). Entretanto, em observações de campo e em laboratório realizadas por El-Naienet al. (1992), verificou-se que *L. longipalpis* pode realizar mais de um repasto sanguíneo antes da oviposição. A picada produz uma pápula circundada por uma área eritematosa de 10 a 20mm de diâmetro (SHARMA e SINGH, 2008).

Formulações tópicas com longo efeito residual são desejáveis para controle sustentável pela saúde pública. No entanto, o intervalo entre as intervenções irá depender na taxa de renovação da população canina (nascimentos/imigração e mortes/emigração) e, no caso de coleiras, na taxa em que são perdidas ou danificadas (COURTENAY et al., 2009).

A proteção potencial de cães contra flebotomos proporcionada pelos inseticidas irá depender de seu efeito repelente ou anti-alimentação, considerado essencial para evitar picadas e, conseqüentemente, a transmissão da doença (MIRÓ et al., 2007), além da redução da sobrevivência daqueles que se alimentam, efeito denominado mortalidade, reduzindo assim a possibilidade de transmitir a LV (DAVID et al. 2001; MOLINA et al., 2001; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002; FRANC e BOUSHIRA, 2009; COUTENAY et al., 2009).

Embora a literatura seja farta no que tange aos aspectos epidemiológicos do uso de inseticidas centrados no cão (DAVID et al. 2001; MOLINA et al., 2001; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002; FRANC e BOUSHIRA, 2009; COUTENAY et al., 2009), pouco se sabe sobre a proteção individual do animal. Objetivou-se, portanto, comparar a eficácia da permetrina 65% e da deltametrina 4% em suas

propriedades de repelência e inseticida sobre *Lutzomyia longipalpis*, para proteção individual do cão, bem como determinar se há diferença na eficácia dos produtos em entre a face interna da orelha e a região inguinal de cão.

2 – Materiais e métodos

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da

2.1 – Animais

Foram utilizados 22 cães (*Canis familiaris*), machos e fêmeas, de raças diversas divididos aleatoriamente em 3 grupos: o grupo controle (GC) com 6 cães, o grupo tratado com permetrina 65% composto (GP) por 8 animais e o grupo tratado com deltametrina 4% (GD) também composto

2.2 – Flebótomos

Cerca de 30 fêmeas e o mesmo número de machos de *Lutzomyia longipalpis* de uma colônia fechada, mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, iniciada a partir de flebotomíneos coletados na cidade de Teresina, Piauí (Brasil) foram utilizadas. Os insetos foram criados segundo a metodologia e condições descritas por Modi e Tesh (1983) e Gontijo (Comunicação Pessoal, 2001). Na

Para este estudo, determinou-se efeito repelência aquele que impede a alimentação das fêmeas nos cães e, o inseticida imediato, a mortalidade dos flebótomos – machos ou fêmeas alimentadas ou não, imediatamente após contato com o produto.

Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 084/2010.

por 8 animais. Os cães eram domiciliados, embora não fosse possível saber quando os tratamentos foram iniciados. Sabia-se apenas que estavam todos com os tratamentos dentro do prazo de utilização determinado pelo fabricante.

manutenção da colônia, as fêmeas eram inicialmente alimentadas com solução glicosada e posteriormente com sangue de hamster (*Mesocricetus auratus*). As larvas recebiam dieta descrita por Modi e Tesh (1983) e modificada por Gontijo (Comunicação pessoal, 2001) O insetário foi mantido à temperatura média de 27°C e umidade de aproximadamente 80% RH e os flebotomíneos mantidos em miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control).

2.3 – Tratamentos

O GC não recebeu qualquer tratamento previamente à exposição aos flebotomos. O segundo grupo, GP, foi tratado com produto a base de permetrina 65% (Pulvex[®]-Intervet), aplicado sob a forma *spot-on* sobre a região interescapular de acordo com o peso do animal. Ainda conforme as instruções da bula, só considerou-se a eficácia total do produto após três

aplicações intervaladas de 30 dias. Já o GD recebeu a coleira impregnada com deltametrina 4% (Scalibor[®]-Intervet), considerando-se a eficácia do produto entre 21 e 120 dias, também conforme as indicações de bula. Nenhum dos animais foi submetido a banhos durante o período experimental.

2.4 – Exposições dos cães aos flebotomíneos

Para a exposição e avaliação dos efeitos repelência e inseticida e da possível alimentação dos insetos, utilizou-se o Flebocontainer, descrito por Costa-Val et al. (2007). Brevemente, o Flebocontainer (fig. 4) é um recipiente em PVC semitransparente, branco de 10 cm de altura por 8,7cm de diâmetro, coberto com tampa rosqueada de 10 cm de diâmetro. Na parte

superior da tampa há uma abertura de 6 cm de diâmetro, que por sua vez é recoberta com tela de náilon de 80 *mesh* por cm² presa com cola de silicone. Na altura de 15 cm há uma abertura de 15 mm de diâmetro para trâmite dos flebotomíneos. O Flebocontainer foi colocado através a parte da tela de náilon diretamente em contato com a pele dos animais.

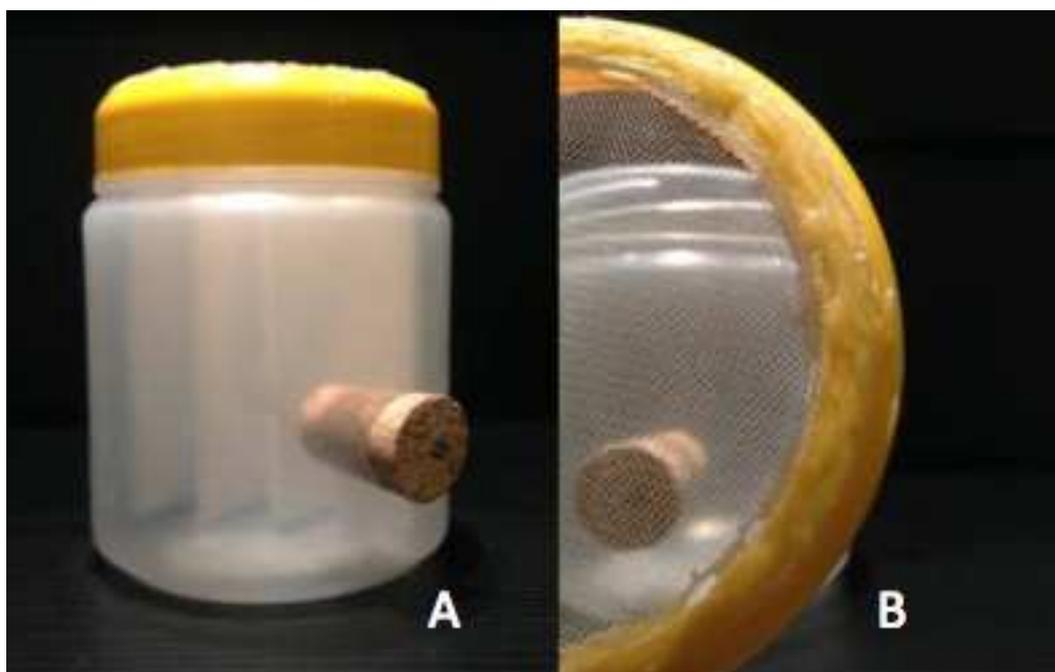


Figura 4 – Flebocontainer. A – Vista geral; B - Vista da tela fina por onde ocorre o contato entre o flebótomo e o cão

Os cães foram sedados com acepromazina (Aceprom 0,2%, Vetnil[®]) na dose de 0,22mg/kg por intramuscular previamente à exposição. Dois Flebocontaineres foram utilizados por cão, sendo um posicionado sobre a face interna da orelha direita (PAD) e o outro na região inguinal direita (RID). Permitiu-se o contato entre os flebótomos e os cães por 40 minutos. Após esse período

2.5 – Análise estatística

Realizou-se análise estatística pelo método do Qui-quadrado, pela natureza dicotômica dos resultados.

o recipiente era retirado e o número de insetos mortos era contado e relatado. Os flebótomos restantes eram mortos por congelamento, procedendo-se posteriormente à sua classificação em machos, fêmeas alimentadas e fêmeas não alimentadas, com auxílio de um estereoscópio (MetrimpexHungary/PZO – Labimex[®]).

3 – Resultados

Os resultados dos grupos GC, GP e GD estão demonstrados nos Gráficos 1, 2 e 3, respectivamente.

3.1 – Efeito repelência

No GC, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de insetos ingurgitados em PAD comparados àquelas ingurgitados em RID.

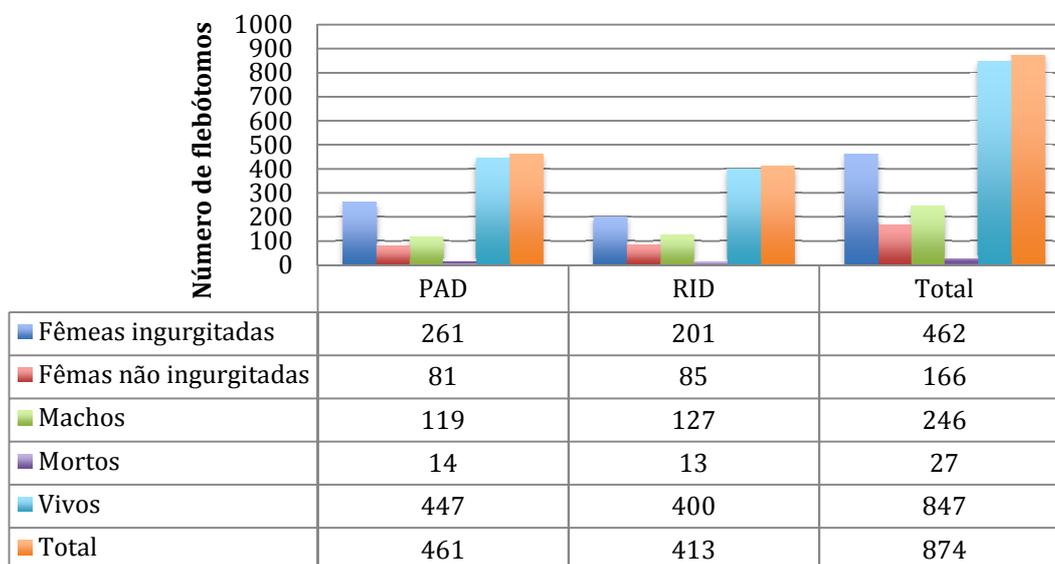
Quando comparados os resultados do GC aos do GD, 70,19% das fêmeas não realizaram o repasto sanguíneo, enquanto 29,81% tornaram-se ingurgitadas, resultando em um efeito repelência estatisticamente significativo ($p < 0,005$).

Comparando os resultados obtidos da exposição dos flebótomos à região auricular (PAD) aos da região inguinal (RID), um

menor número de fêmeas se alimentou em RID, com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Comparando-se o número de flebótomos que se alimentaram no GC (36%), observou-se menor número de insetos alimentados em GD (13%), com diferenças estatísticas ($p < 0,0001$). O mesmo resultado foi observado ao comparar-se exclusivamente os insetos expostos à PAD, sendo que 39% alimentaram-se nessa região no GC e 7% apenas alimentaram-se no GD ($p < 0,0001$).

Gráfico 1 - Número de flebótomos expostos e sua classificação no Grupo Controle (GC)



Os resultados da análise entre o GC e o GP também demonstraram efeito repelência com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$), na qual o GP possuiu melhores resultados. De todas as fêmeas expostas aos

cães, 34% alimentaram-se no GC e 17% no grupo GP. O número de fêmeas alimentadas no PAD foi menor no GP que aquele encontrado no GC, conforme exposto: no GC, 33% ingurgitaram e, no

GP, 21%, um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,0001$).

Analisando o Gráfico 3, que representa a classificação dos flebótomos expostos a cães utilizando a coleira impregnada com deltametrina 4%, houve efeito relepente estatisticamente significativo ($p < 0,05$):

23% das fêmeas fizeram o repasto sanguíneo e 74% não o fizeram.

Comparando as regiões utilizadas na exposição, o maior número de fêmeas ingurgitadas foi encontrado na RID, também com diferenças estatísticas ($p < 0,01$).

Gráfico 2 - Número de flebótomos expostos e sua classificação no Grupo Permetrina (GP)

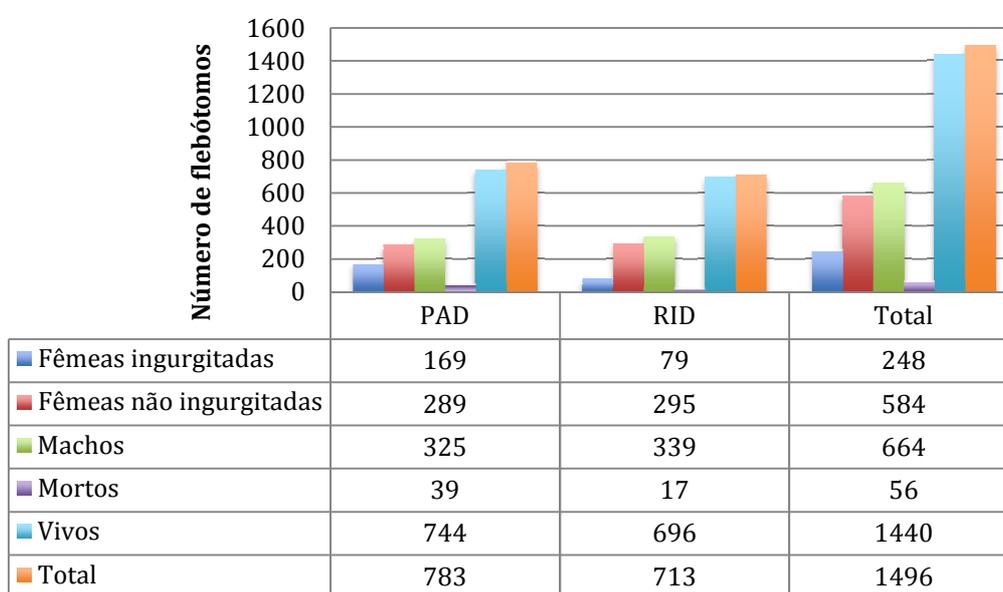
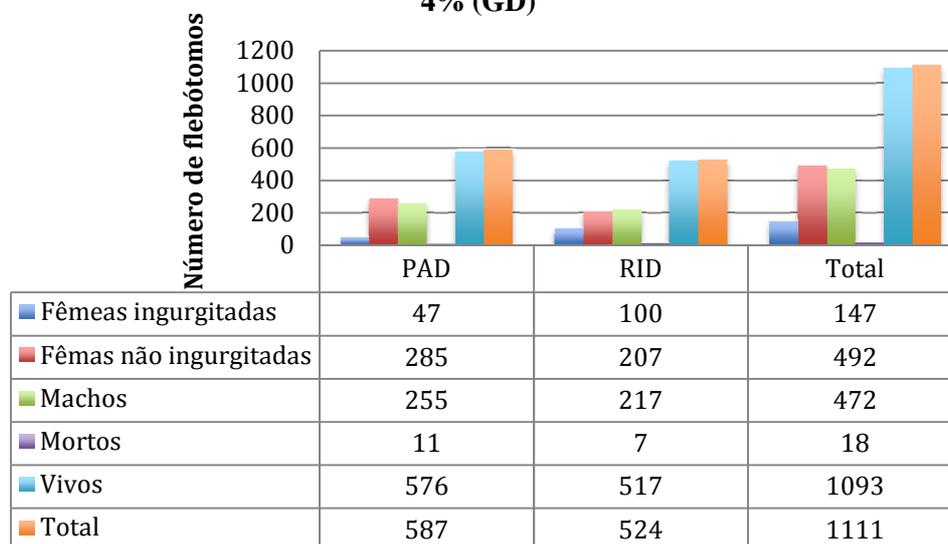


Gráfico 3 - Número de flebótomos expostos e sua classificação no Grupo tratado com a coleira impregnada com Deltametrina 4% (GD)



3.2- Efeito inseticida

Não houve diferença estatística significativa entre o número de insetos (machos e fêmeas) mortos no GC (1%) e aqueles mortos no GP (2%). Comparando os dados relativos à exposição dos flebótomos expostos à PAD, também não houve diferença estatística entre o número de mortos no GP (3%) e no GC (1%). Resultados similares foram encontrados ao comparar-se a mortalidade daqueles expostos à RID: houve morte de 1% dos insetos do grupo controle (GC) e de apenas 2% dos flebótomos do grupo permetrina 65% (GP).

Quando o Graf. 2 é analisado, os dados demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) para o efeito

inseticida: 96,26% estavam vivos e 3,74% foram mortos ao fim da exposição. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a mortalidade dos insetos ocorrida no PAD e RID, sendo que no pavilhão auditivo direito foi o efeito mais pronunciado.

No GD, foi observada a morte de 1% dos flebótomos foi observada quando expostos às regiões PAD e RID e o mesmo resultado foi obtido entre o número de insetos mortos de GC. Resultados similares foram obtidos entre a mortalidade do resultado GC (1%) e do GD (1%) nas regiões PAD e RID.

De acordo com dados do Graf. 3, houve uma diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre o número de insetos

mortos (1,62%) e vivos (98,8%) ao final da exposição.

3.3 – Comparação entre os grupos da permetrina 65% (GP) e da deltametrina 4% (GD)

Quando os efeitos inseticida destes grupos (Graf. 4) são comparados, a análise estatística demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o efeito inseticida, no qual o GP contabilizou 1% de

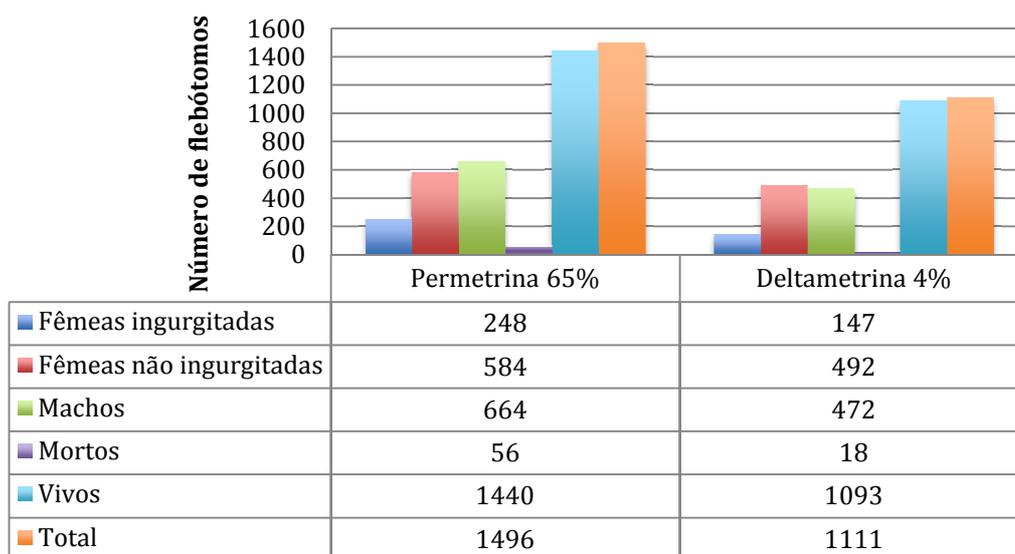
insetos mortos e o GD 2%. O efeito repelência também foi melhor no GP (40%) que no GD (33%, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$).

4 – Discussão

Diversos estudos avaliaram a eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4% (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; REITHINGER et al., 2001; DAVID et al., 2002; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002; FERROGLIO et

al., 2008; FRANC e BOUSHIRA, 2009) e alguns avaliaram a eficácia da permetrina 65% (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; FERROGLIO et al., 2008; MOLINA et al., 2012).

Gráfico 4 - Comparação entre o grupo permetrina 65% (GP) e o grupo tratado com coleira impregnada com deltametrina 4% (GD)



A maioria dos estudos têm demonstrado efeitos de repelência e mortalidade elevados da coleira impregnada com deltametrina a 4% (KILLICKKENDRICK et al., 1997; REITHINGER et al., 2001; DAVID et al., 2001; FERROGLIO et al., 2008), ou a permetrina 65% (GIFFONI et al., 2002; FERROGLIO et al., 2008), sendo recursos de grande valor para a prevenção da infecção em cães (FERROGLIO et al., 2008; GIFFONI et al., 2002; MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002).

Embora grande parte dos trabalhos dos estudos demonstrem efeitos de repelência e mortalidade elevados da coleira impregnada com deltametrina a 4% (KILLICKKENDRICK et al., 1997; REITHINGER et al., 2001; DAVID et al., 2001; FERROGLIO et al., 2008), diferentes espécies de flebótomos foram testados. Um dos estudos demonstrou que o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% reduziu o número de fêmeas ingurgitadas em cães tratados por um período de 2 a 34 semanas após a colocação da coleira, com menos de 13% de fêmeas alimentadas. A espécie testada foi *Phlebotomus perniciosus*, pertencente a uma colônia de laboratório (KILLICK KENDRICK et al., 1997). Outros autores reportaram que o efeito repelência mais efetiva foi obtido no segundo mês de tratamento, com 68% de fêmeas alimentadas de *Lutzomyia*

intermedia, previamente capturadas no ambiente (REITHINGER et al., 2001). David et al. (2001) utilizaram fêmeas de *L. longipalpis* e observaram um efeito repelência de 99,3% após 4 meses de colocação da coleira, 100% da oitava à décima-segunda semanas e acima de 96% após 16 a 22 semanas desde a colocação. Em outro estudo houve uma redução de 51% para 11% na alimentação de *P. papatasi* obtidos do ambiente natural após uma semana de uso (HALBIG et al., 2000). O presente estudo observou um efeito de repelência de 74% utilizando *L. longipalpis* criados em uma colônia de laboratório. Muitas outras diferenças entre estes estudos podem explicar os diferentes resultados. Dois dos estudos previamente discutidos expuseram os cães por dois horas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001) e outros dois expuseram os cães por 7 horas (DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2001). O presente estudo expôs os cães aos flebótomos por 40 minutos e utilizou uma metodologia diferente, o Flebocontainer, ao invés de colocar os cães dentro de gaiolas individuais dentro das quais flebótomos eram soltos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2001). Alguns estudos testaram as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% por 35 semanas

consecutivas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001), enquanto outros testaram a mesma coleira após 8 dias de sua colocação (HALBIG et al., 2000) e nos dias 0, 5 e 12 da colocação (REITHINGER et al., 2001). Este estudo expôs os cães aos flebótomos em dias variados após sua colocação, mas dentro do período de ação, conforme recomendando pelo fabricante.

O efeito inseticida encontrado neste estudo foi de 1,62%, refletindo o pequeno número de insetos que morreram após serem expostos aos cães utilizando a coleira impregnada com deltametrina 4%. Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo, no qual a mortalidade após 7 horas de contato foi de 13% nos cães que utilizavam a coleira e de 9% em animais não tratados, sem resultados estatisticamente significativos (HALBIG et al., 2000). David et al. (2001) encontraram mortalidade de 96% dos flebotomíneos após 4 semanas de uso da coleira impregnada de deltametrina 4% e de 35% após 35 semanas, o que é estatisticamente relevante quando comparado ao grupo controle (DAVID et al., 2001). Reithinger et al. (2001) demonstraram 30% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas após 1 mês de uso e nenhuma mortalidade significativa após o segundo mês de uso, entretanto, os resultados diferem dos

obtidos por Killick-Kendrick et al. (1997), no qual o efeito inseticida variou de 25 a 64% durante os testes realizados entre a segunda e a 34ª semana. No estudo aqui apresentado, os efeitos repelência e mortalidade causados pela coleira impregnada com deltametrina 4% foram pequenos, apesar de estatisticamente significativos quando comparados aos números de fêmeas alimentadas e flebótomos vivos, respectivamente. Resultados tão distintos podem ter ocorridos pelas seguintes razões: em dois estudos, os autores testaram o produto contra flebótomos do gênero *Phlebotomus* (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000); e no presente estudo, os cães foram expostos aos insetos por 40 minutos, enquanto em outros eles foram expostos por 2 horas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001) e, em outros, por 7 horas (HALBIG et al., 2000; REITHINGER et al., 2001) e a metodologia de exposição foi distinta, conforme discutido no parágrafo anterior. O presente estudo e os estudos de outros autores (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; DAVID et al., 2001) realizaram a sedação dos cães, enquanto Reithinger et al. (2001) optou por não sedar os animais afim de obter resultados mais fidedignos à realidade.

Poucos estudos testaram a proteção individual do cão após a aplicação de permetrina 65% (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012). No estudo de Molina et al. (2001), a permetrina 65% demonstrou efeito repelência de 78,5% no sétimo dia, com uma variação de 0 a 42,1% do dia 14 ao dia 91 e o efeito inseticida foi 100% no sétimo dia e 91,4% no vigésimo oitavo dia. Em outro estudo a taxa de repasto sanguíneo apenas reduziu significativamente aos 2 meses nos cães tratados com permetrina (REITHINGER et al., 2001). Alguns outros autores demonstraram que o efeito repelência reduziu gradativamente após a aplicação tópica do produto, mas ainda estava aceitável no 22º dia (67,6%) (MOLINA et al., 2012). A permetrina 65% tópica foi capaz de proteger os cães por 22 dias de acordo com Molina et al. (2001). No presente estudo, o efeito repelência foi de 70,19% e o inseticida de 3,74%. Os resultados diferentes podem ser pela utilização de espécies distintas de flebótomos, sendo que no estudo aqui apresentado, foram utilizados *L. longipalpis* proveniente de uma colônia fechada de laboratório. Em dois dos estudos (MOLINA et al., 2001; MOLINA et al., 2012) foram utilizados *Phlebotomus perniciosus* também originários de colônia de laboratório e, em outro, foram utilizados *L.*

intermedia capturados no ambiente (REITHINGER et al., 2001). O tempo desde a aplicação do produto à exposição dos cães aos flebótomos, neste estudo, não era conhecido previamente, enquanto em outros a permetrina 65% foi testada em períodos pré-determinados e controlados (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012). Além da diferença climática, as diferentes metodologias ficam evidentes, uma vez que o estudo aqui apresentado utilizou o Flebocontainer enquanto outros expuseram os cães aos insetos em gaiolas de tecido (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012).

Piretroides sintéticos distribuem-se pela pele do cão através das secreções dérmicas (DAVID et al., 2001) e a permetrina 65% impregna o estrato córneo (MOLINA et al., 2001). O presente estudo sugere que a distribuição da deltametrina e da permetrina não é homogênea no corpo do cão, uma vez que houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados em PAD e RID. A permetrina 65% demonstrou efeito repelência mais efetivo em RID e o inseticida em PAD, enquanto a deltametrina demonstrou menos capacidade de repelência em RID e não houve diferença na mortalidade dos insetos entre os locais estudados (PAD e RID).

A comparação dos efeitos repelência e inseticida entre a permetrina 65% e a coleira impregnada com deltametrina 4% foi encontrada em apenas dois estudos (REITHINGER et al., 2001; FERROGLIO et al., 2008) e a permetrina obteve melhores resultados no presente estudo.

De acordo com Reithinger et al. (2001), a deltametrina 4% demonstrou melhor efeito inseticida durante os dois primeiros meses de tratamento, embora na primeira semana nenhum efeito tenha sido observado. Já a aplicação da permetrina 65% obteve um aumento de 5 vezes no número de flebótomos não alimentados após a primeira semana, embora seu efeito não

seja duradouro. O efeito inseticida da deltametrina 4% foi o maior, estendendo-se até 2 meses após o tratamento. Após 2 meses os autores observaram um efeito repelência melhor da deltametrina, com redução de 69% no número de fêmeas ingurgitadas.

No estudo de Ferroglio et al. (2008), tanto a permetrina 65% quanto a deltametrina 4% foram capazes de reduzir a possibilidade dos cães se infectarem.

Os resultados distintos do presente estudo podem ter sido causados por diferença na metodologia e espécies de flebótomos utilizados, conforme já discutido previamente.

5 – Conclusões

Nas condições experimentais empregadas, pode-se concluir que:

- O tratamento dos cães com piretroides sintéticos para sua proteção individual é uma importante estratégia para reduzir as taxas de infecção. No entanto, conforme observado neste estudo, os efeitos repelência e inseticida foram pequenos e esses piretroides sintéticos podem não prover a proteção individual necessária aos cães em áreas endêmicas.

- Dentre os produtos testados, a permetrina exibiu melhores resultados em ambos os efeitos estudados a partir da aplicação segundo as instruções do fabricante e o

respeito à duração de tratamento. No entanto, ainda que melhor que o efeito inseticida da deltametrina, a mortalidade dos flebótomos em cães em uso de permetrina foi pequena e pode não prover a proteção ideal aos cães.

- A mortalidade de flebótomos causada pela coleira impregnada com deltametrina 4% é pequena: poucos insetos morreram após o contato direto com cães utilizando-a. Não houve diferença estatisticamente significativa neste efeito também nas diferentes regiões testadas (PAD e RID).

- A permetrina 65% demonstrou efeito repelência mais efetivo em RID e o

inseticida em PAD, enquanto a deltametrina demonstrou menor capacidade de repelência em RID e não houve diferença

na mortalidade dos insetos entre os locais estudados.

CAPÍTULO 3: Avaliação dos efeitos repelência e inseticida sobre *Lutzomyia longipalpis* em cães utilizando a coleira impregnada com deltametrina 4%, submetidos ou não a banhos quinzenais

1. Introdução

A leishmaniose canina é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (Trypanosomatidae: kinetoplastida) é altamente prevalente em todos os países da sub-região do Mediterrâneo e de muitos países latino-americanos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997). Como um problema veterinário, a leishmaniose visceral canina (LVC) é ofuscada pelo fato dos cães serem reservatórios da doença. Devido a isso, grande parte dos esforços direcionados ao controle da doença nos cães é direcionada a reduzir o risco da infecção humana, e não em proteger o cão em si (KILLICK-KENDRICK et al., 1997).

Esta doença dependente de vetor é uma infecção emergente que está se adaptando às mudanças ambientais e disseminando-se por novas regiões geográficas (CLABORN, 2010). O único vetor conhecido da LVC é um pequeno díptero da família Psychodidae e da subfamília Phlebotominae (KILLICK-KENDRICK, 1999; SHARMA e SINGH,

2008; CLABORN, 2010). A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é o principal vetor urbano da leishmaniose no Brasil (SANT'ANNA et al., 2008; FREITAS et al., 2012), embora o *L. cruzi* também seja capaz de transmitir promastigotas infectantes (FREITAS et al., 2012).

O melhor método para controle de qualquer doença dependente de um vetor é a redução do contato homem-vetor (SHARMA e SINGH, 2008). A prevenção efetiva contra picadas de flebótomos pode ser alcançada com recursos utilizados em conjunto: manter o cão dentro de casa do anoitecer ao amanhecer, reduzir os micro-habitats favoráveis aos insetos nas proximidades da casa ou de locais onde os cães permanecem por maior período, utilização de tratamento ambiental com inseticida e o uso de inseticidas tópicos com efetividade provada contra os vetores (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A proteção de cães contra flebótomos através dos produtos dependerá de seu efeito repelente, essencial para evitar picadas e conseqüentemente a transmissão da doença (MIRÓ et al., 2007), além da redução da sobrevivência daquelas fêmeas que se alimentam, efeito inseticida, reduzindo assim a possibilidade de transmissão (DAVID et al. 2001; MOLINA et al., 2001; MAZLOUMI GAVGANIET al., 2002; FRANC e BOUSHIRA, 2009; COURTENAY et al., 2009).

Formulações tópicas com ação residual longa são desejáveis para controle público sustentável. Atualmente, as medidas preventivas são baseadas principalmente no uso de produtos registrados para uso veterinário contendo piretroides sintéticos, como a permetrina ou a deltametrina (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Dentre essas opções encontra-se coleiras para cães produzidas em PVC e impregnadas com o piretroide sintético deltametrina, em uma concentração de 40mg/g (KILLICK-KENDRICK et al., 1997), uma alternativa potencialmente viável para a proteção dos cães (ALEXANDER e MAROLI, 2003), que poderia ser integrada à vacinação canina para controle da LVC (MIRÓ et al., 2008). A proteção individual do cão obtida com o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% foi estudada por diferentes

autores (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; COURTENAY et al., 2009) que obtiveram diferentes resultados entre si.

Não há, na literatura, dados sobre a eficiência da coleira usadas em cães banhados com frequência, embora relata-se que redução de 8% na eficiência da coleira impregnada com deltametrina a cada exposição a xampus ou químicos presentes em piscinas, apesar de ser a prova d'água (POLONKO, Comunicação Pessoal, 2012). Alterações laboratoriais decorrentes do uso de piretroides são raramente descritas. Após a exposição oral, foi observada leucocitose em 15% de humanos expostos entretanto, na maioria dos animais utilizados em estudo toxicológicos não foram percebidas alterações hematológicas. Em coelhos, observou-se redução no número de hemácias, redução dos níveis de hemoglobina e reduzida concentração de hemoglobina corpuscular média, já em cães após exposição oral por 8 semanas, foi observada anemia. As reações observadas foram atribuídas a respostas adaptativas e não pela hematotoxicidade induzida por piretroides (DANIEL et al., 2003). Alterações bioquímicas citadas incluem apenas redução das proteínas plasmáticas e aumento da albumina em camundongos

machos expostos também por via oral (DANIEL et al., 2003).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito inseticida imediato e o efeito repelência obtidos com o uso da coleira por cães submetidos a banhos quinzenais ou não, bem como avaliar a ocorrência de alterações laboratoriais durante o período

2. Material e métodos

2.1 – Animais

Foram utilizados 12 cães, de ambos os sexos, sem raça definida, pesando entre dez e 25 quilogramas. Os animais eram provenientes de abrigos particulares.

Durante o período de adaptação de 40 dias, os cães receberam uma dose de vacina óctupla (Vanguard HTLP 5/CV-L® Pfizer) e anti-rábica (Defensor® Pfizer). Também foi realizada medicação anti-helmíntica com pamoato de pirantel (144mg), praziquantel (50mg) e febantel (150mg) (Duprantel Plus® qaDuprat), na dose de 1 comprimido para cada dez quilogramas de peso vivo, repetido após 15 dias.

Os cães foram mantidos em canis individuais, com área aberta e abrigo contra intempéries, no Canil Experimental de Pequenos Animais, situado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de

de utilização da coleira impregnada com deltametrina 4%.

Para este estudo, determinou-se efeito repelência como sendo aquele que impede a alimentação das fêmeas nos cães e, o inseticida imediato, o que causa a mortalidade dos flebótomos – machos ou fêmeas, imediatamente após contato com o produto.

Minas Gerais, recebendo ração (Pedigree Adultos Carne e Vegetais® Mars) e água à vontade. Foi realizado enriquecimento ambiental com passeios, brincadeiras com bolinhas, garrafas pet e ossos de raspa de couro.

Todos os cães foram submetidos a exame físico completo e possuíam sorologia negativa para leishmaniose visceral canina (RIFI e ELISA) antes da admissão nos grupos experimentais. Os exames laboratoriais estavam dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie, tanto o hemograma quanto os bioquímicos.

Os procedimentos com os cães foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA UFMG processo nº 315/2012).

2.2 – Flebotomíneos

Foram utilizados machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de uma colônia fechada, mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A colônia foi iniciada a partir de flebotomíneos obtidos na cidade de Teresina, Piauí (Brasil). Os insetos foram criados segundo a metodologia e condições descritas por Modi e Tesh (1983) e Gontijo (Comunicação pessoal, 2001). Na manutenção da colônia, as fêmeas eram

inicialmente alimentadas com solução glicosada e posteriormente com sangue de hamster (*Mesocricetus auratus*). As larvas recebiam dieta descrita por Modi e Tesh (1983) e modificada por Gontijo (comunicação pessoal, 2001). O insetário foi mantido à temperatura média de 27°C e umidade de aproximadamente 80% RH e os flebotomíneos mantidos em miniaturas de armadilhas CDC (Center for Disease Control).

2.3 – Gaiola para exposição dos cães aos flebotomíneos

Para alimentação nos cães, os flebotomíneos foram soltos em uma gaiola idealizada para este experimento. A gaiola consistia em uma armação de metal em formato retangular, com 70 cm de altura, 70cm de largura e 180 cm de comprimento. Preso à armação em suas extremidades, havia uma câmara feita com tecido tule liso tradicional nas mesmas medidas da armação de metal. Porém, a extremidade direita era fechada com zíper e possuía uma extensão de tecido de 50 cm que permitia

seu fechamento por um cordão de tecido. Na extremidade esquerda havia também uma extensão de tecido de 50 cm que era fechada por um cordão após posicionamento dos cães e antes da liberação dos flebotomíneos, de modo a impedir fugas. Na lateral foram feitas duas mangas para o exterior, de 7cm de diâmetro, para que o interior da gaiola pudesse ser acessado sem risco de fuga de flebotomíneos (figuras 4 e 5).

2.4 – Coleira impregnada com deltametrina 4%

As coleiras utilizadas no experimento consistiam de uma faixa branca, de 65cm de comprimento, de polivinilclorido (PVC) pesando 25g e impregnadas com 40mg/g de

deltametrina. Foram colocadas nos cães após a primeira exposição. Segundo às recomendações do fabricante: deixou-se um espaço de dois dedos entre a coleira e o

pescoço do animal. Dependendo do porte e características individuais dos animais, algumas coleiras tiveram o excesso cortado,

2.5 – Grupos experimentais

Os cães foram divididos em dois grupos, por seleção aleatória.

Grupo 1: seis cães (quatro machos e duas fêmeas) tiveram a coleira impregnada com deltametrina a 4% aplicada ao pescoço e foram submetidos a banho com xampu

embora deixando 5 centímetros entre o local do corte e à fivela.

(SanolDog Neutro® Total Química) neutro a cada 15 dias, durante todo o experimento.

Grupo 2: seis cães (três machos e três fêmeas) tiveram a coleira impregnada com deltametrina a 4% aplicada ao pescoço e não foram submetidos a banhos por todo o período do experimento.

2.6 – Tratamentos

Os insetos foram submetidos à alimentação nos cães para avaliação dos efeitos inseticida imediato, repelência e mortalidade nos momentos:

T0 – antes da aplicação da coleira impregnada de deltametrina a 4%.

T7 – Sete dias após a aplicação – correspondente ao início da ação da coleira.

T21 – Vinte e um dias após a aplicação. – correspondente ao pico de distribuição do inseticida na pele do animal.

T60 – Sessenta dias após a aplicação.

T120 – Cento e vinte dias após a aplicação.

2.6.1 – Exposição dos flebotomíneos aos cães

Os grupos foram expostos em dias distintos. Os cães foram sedados com a associação de acepromazina 0,2% (Aceprom 0,2%® Vetnil) na dose 0,05mg/kg e cloridrato de petidina 50mg/ml (Cloridrato de Petidina® (ampola de 2ml com 100mg União Química) na dose de 5mg/kg por via intra-muscular. Após sedação, o cão foi posicionado em decúbito

lateral dentro da gaiola de exposição, cujas extremidades foram fechadas e conferidas, e posteriormente os flebótomos foram soltos através das mangas que permitiam o acesso ao interior da gaiola. O ambiente foi mantido em penumbra e os flebótomos permaneceram em contato com o cão por 40 minutos. Em seguida, foram aspirados por um aspirador de carro de baixa

potência, adaptado com uma extensão de cano de PVC de 30cm. Foram soltos em uma miniatura de armadilha CDC e posteriormente congelados. Após a aspiração de todos os flebótomos vivos e sua soltura na armadilha, o cão teve seu

pelame aspirado, bem como o chão da gaiola, para recolhimento dos flebótomos mortos. O cão foi retirado e, após recuperação da sedação, levado de volta ao canil individual.

2.7 – Classificação dos flebotomíneos

Os insetos foram inicialmente separados entre vivos e mortos, machos e fêmeas e, entre as fêmeas, ingurgitadas ou não ingurgitadas.

Os flebótomos mortos recolhidos eram classificados em machos e fêmeas e, dentre as fêmeas, entre ingurgitadas e não ingurgitadas. Os resultados eram registrados em planilha apropriada, correspondente ao tempo realizado na ocasião (Anexo 1, 2, 3).

Os flebótomos vivos e aspirados foram congelados previamente à classificação, realizada da mesma maneira que para os insetos mortos. A contagem final foi registrada em planilha apropriada, correspondente ao tempo realizado (Anexo 1, 4, 5).

Foram consideradas ingurgitadas as fêmeas que possuíam qualquer quantidade de sangue em seu abdome (figuras 7, 8, 9, 10, 11), visualizadas com auxílio de um estereoscópio.

2.9 – Colheita e preparação de material para análise laboratorial

2.9.1 – Sangue e soro

Amostras de sangue de cada cão foram coletadas a cada 15 dias durante todo o período do experimento, por punção da veia cefálica. Uma amostra era coletada em frasco com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético – EDTA) (EDTA

KE/1,2ml – Sarsted Monovette) para realização de hemograma. Uma segunda amostra era obtida através da punção da veia cefálica em frasco sem anti-coagulante (S-Monovette–serumcollection 7,2ml) para execução de testes bioquímicos.

2.10 – Análise laboratorial

Para análise dos resultados de hemograma e análises bioquímicas foram utilizados os

valores de referência para a espécie, utilizados pelo Laboratório de Patologia

Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais. Os

valores de referência estão descritos no anexo 6.

2.10.1 – Hemograma

O sangue colhido e armazenado em tubo com EDTA foi submetido à análise semi-automatizada (SistemaCelm CC 530) para obtenção dos valores totais de hemácias, leucócitos e plaquetas. Para realização de diferencial de leucócitos, estudo de morfologia de hemácias, plaquetas e leucócitos foram realizados esfregaços

sanguíneos e avaliados por microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse E200).

Para realização de diferencial de leucócitos, estudo de morfologia de hemácias, plaquetas e leucócitos foram realizados esfregaços sanguíneos e avaliados por microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse E200).



Fig. 5 – Gaiola para exposição dos cães aos flebótomos.



Fig. 6 – Aspiração dos flebotomíneos vivos, com o cão ainda posicionado dentro da gaiola, através das mangas laterais.



Fig. 7 – Fêmea de *L. longipalpis* não ingurgitada.



Fig. 8 – Fêmea de *L. longipalpis* com discreto ingurgitamento com sangue.



Fig. 9 –Fêmea de *L. longipalpis* ingurgitada com sangue.

Fig. 10– Fêmea de *L. longipalpis* com marcante ingurgitamento com sangue.



Fig. 11 –Fêmea de *L. longipalpis* com marcante ingurgitamento com sangue.



Fig. 12 – Sequência de três fêmeas ingurgitadas (esquerda para direita) e uma não ingurgitada de sangue.

2.10.2 – Bioquímica sérica

O soro de cada amostra foi obtido após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, separado em alíquotas de dois mililitros e

submetido a análise por metodologia semi-automatizada (Bio – 2000) para obtenção dos parâmetros.

2.11 – Análises estatísticas

Os dados paramétricos foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste Tukey-Kramer.

Os dados referentes à análise do efeito inseticida do Grupo I foram convertidos em seus próprios valores de tangente para

obtenção de valores paramétricos e análise por ANOVA. Já os referentes ao efeito repelência foram convertidos em seus próprios valores de cosseno para obtenção de dados que obedeçam a normalidade para análise por ANOVA.

3. Resultados

3.1 – Comparações entre os tempos

3.1.1 – Grupo 1

3.1.1.1 – Efeito inseticida

Para obtenção das porcentagens individuais relacionadas ao efeito inseticida, somou-se todos os insetos (100%) e a partir do número de flebótomos mortos (machos ou fêmeas) determinou-se o resultado (Anexo 1).

Após conversão dos dados para obtenção de normalidade ($y=\tan(y)$) e análise a partir do

ANOVA e pós-teste Tukey-Kramer, não houve, de acordo com a análise estatística realizada, diferença significativa maior que a esperada, entre os valores de mortalidade de insetos obtidos a cada tempo (Gráficos 5 e 9).

3.1.1.2 – Efeito Repelência

A porcentagem referente ao efeito repelência foi obtida apenas com o uso das fêmeas vivas e mortas como total e apenas

as fêmeas não alimentadas, vivas ou mortas (Gráficos 7 e 9).

Houve diferença estatisticamente significativa (Gráfico 6) apenas entre os

tempos T0 e T120, sendo o efeito de menor magnitude no T0 (71,1%).

3.1.2 - Grupo 2

3.1.2.1 – Efeito inseticida

Quando comparados entre si os tempos do grupo 2, houve diferença significativa apenas entre os efeitos obtidos no T21 e no T120 ($p < 0,05$), com melhores resultados

obtidos após 21 dias da aplicação (21,9%) em relação aos dados após 120 dias (7%) de aplicação (Gráficos 7 e 10).

3.1.2.2 – Efeito repelência

Os dados foram convertidos em seus próprios cossenos ($y = \cos(y)$) para obtenção normalidade, quando foram então testados através do ANOVA e pós-teste Tukey-Kramer.

Não houve, de acordo com as análises estatísticas, diferenças significativas entre os tempos (Gráfico 8 e 9).

Gráfico 5 – Efeito inseticida em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G1.

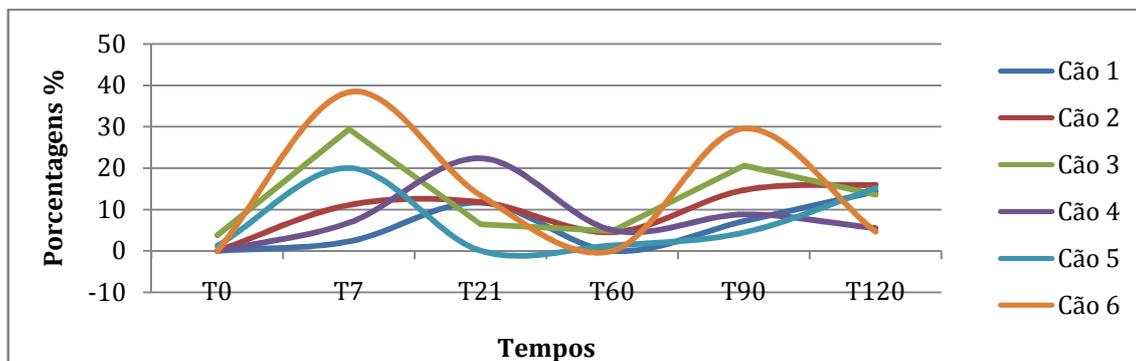


Gráfico 6 – Efeito repelência em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G1..

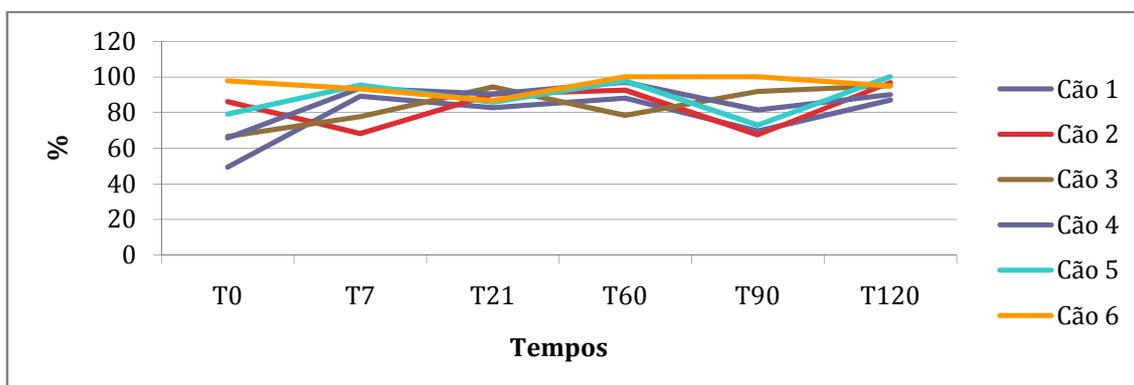


Gráfico 7 – Efeito inseticida em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G2.

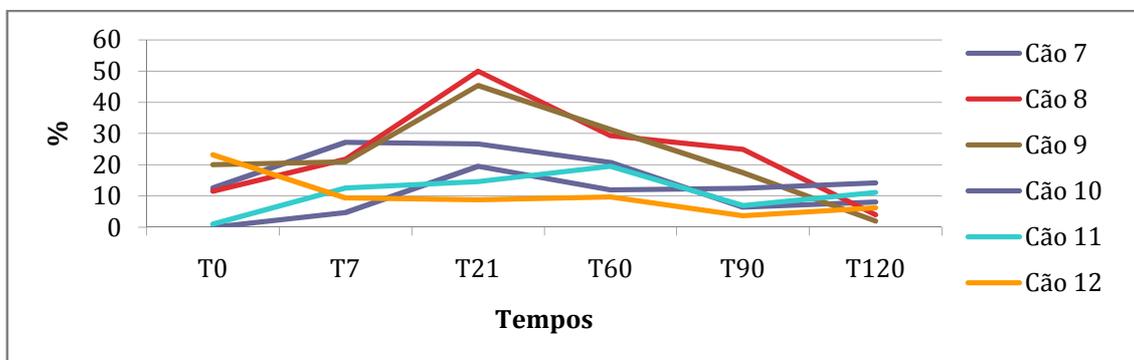


Gráfico 8 – Efeito repelência em cada tempo, individualmente, em porcentagens (%), do G2.

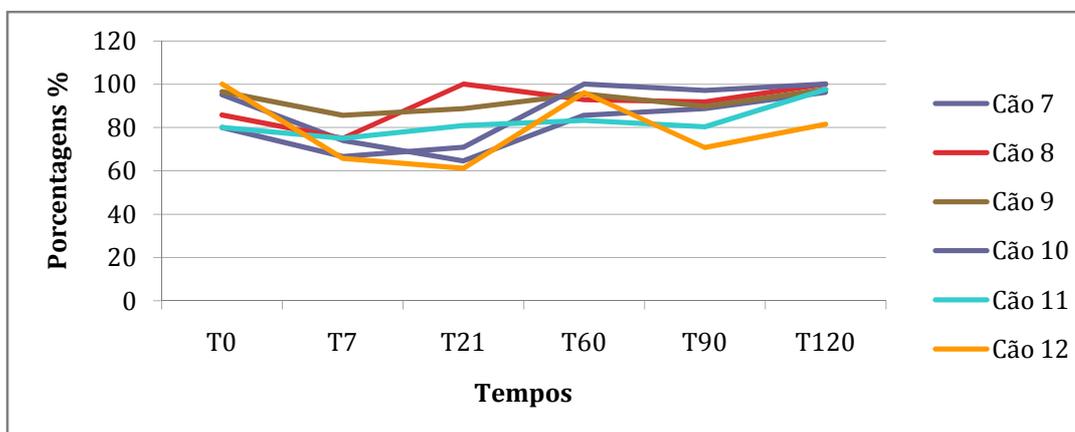


Gráfico 9 – Médias do efeito inseticida (insetos mortos) dos grupos, em porcentagem.

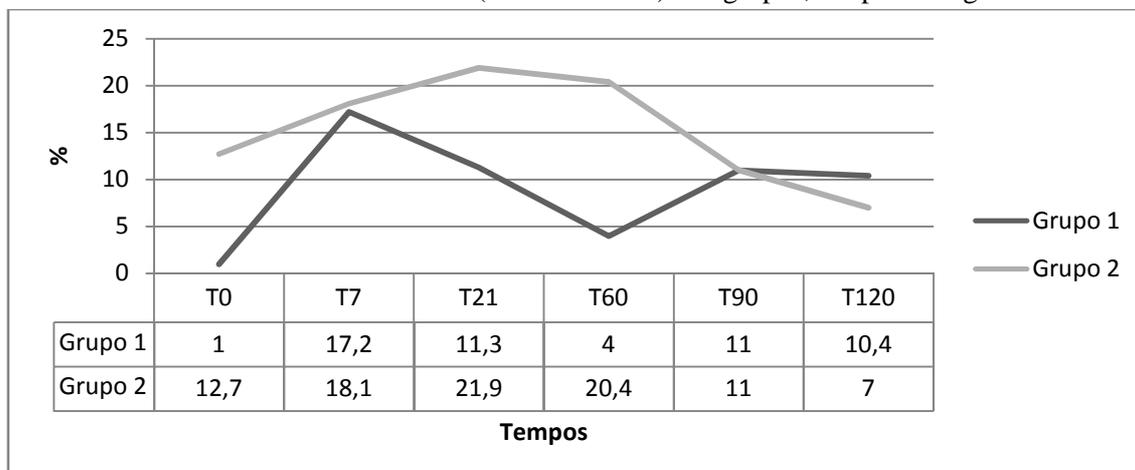
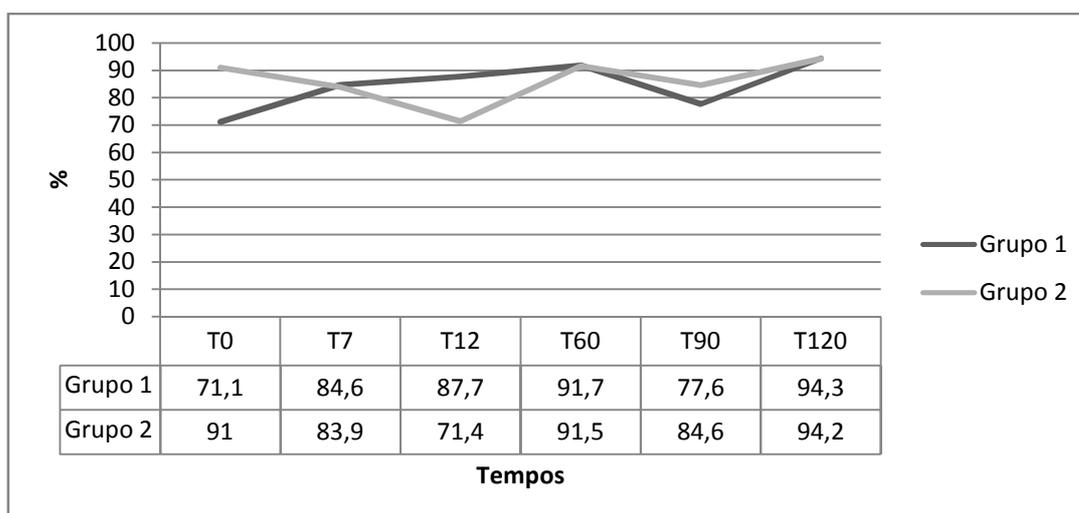


Gráfico 10 – Médias do efeito repelência (fêmeas não alimentadas) dos grupos, em porcentagem.



3.2 – Comparações entre os Grupos 1 e 2

3.2.1 – Efeito inseticida

Os grupos com banho (G1) e sem banho (G2) foram comparados através do Qui-quadrado em cada tempo de exposição aos flebótomos (Gráfico 14).

O T0, correspondente ao momento inicial de exposição, no qual nenhum dos grupos utilizava a coleira impregnada com deltametrina 4% ou qualquer outro

ectoparasiticida. Nesse momento, de acordo com a análise, houve diferença considerada muito significativa ($p < 0,0001$) entre G1 e G2, sendo que em G2 houve maior mortalidade dos flebótomos, correspondendo a 5% do total exposto aos animais.

No T7, equivalente a 7 dias após colocação da coleira e, segundo o fabricante, corresponde ao início da ação do produto e os resultados foram considerados não significativos estatisticamente, comparando-se o G1 ao G2.

Aos 21 dias após a colocação da coleira, momento considerado pelo fabricante como o pico de ação da coleira impregnada com deltametrina 4%, a diferença entre o efeito inseticida dos dois grupos foi considerada

muito significativa ($p = 0,0016$), sendo em G2 o melhor efeito inseticida (9%) em comparação ao G1 (7%).

No T60, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O G1 demonstrou maior mortalidade de flebótomos (51%) que o G2 (2%).

Após 90 e 120 dias, equivalentes aos T90 e T120, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas.

3.2.2 – Efeito Repelência

Os grupos foram comparados através do Qui-quadrado, em cada tempo de exposição aos flebótomos (Gráfico 15).

No T0 houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), com G1 apresentando repelência de 45% e G2 33%.

Aos 7 dias a diferença encontrada entre os grupos também foi considerada significativa ($p = 0,0202$), no qual G1 apresentou maior repelência (40%),

diferença observada também no T21 ($p = 0,0003$) e o melhor efeito sendo constatado também no G1 (56%) em relação ao G2 (26%).

A partir dos 60 dias de uso da coleira, entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em todos os tempos restantes (T60, T90 e T120).

3.3 – Efeito inseticida em fêmeas ingurgitadas

3.3.1 – Fêmeas ingurgitadas e mortas

O número de fêmeas mortas e ingurgitadas foi comparado entre os dois grupos através do Qui-quadrado e de Kruskal-Wallis.

O G1 não apresentou diferenças significativas quando os tempos foram comparados entre si. Entretanto, o G 2

apresentou diferenças estatisticamente significativas apenas entre os tempos T0-T7, T7-T21, T7-T60. Os tempos T0, T21 e T60 não apresentaram fêmeas ingurgitadas e mortas.

No Qui-quadrado, apenas T0 apresentou diferenças significativas entre G1 e G2. Nos outros tempos, exceto T60, no qual não foi possível realizar o teste uma vez que

uma das colunas foi preenchida com o número zero, não ocorreram diferenças estatísticas significativas.

3.3.2 – Fêmeas ingurgitadas e vivas

As médias entre os grupos, em porcentagem, das fêmeas ingurgitadas que foram capazes de sobreviver após a exposição ao produto podem ser vistas no Gráfico 12.

Ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0005$) entre G1 e G2 em T0, T7 e T21. Em T0, G1 apresentou maior número de fêmeas ingurgitadas e vivas (G1:

15%; G2: 3%). Nos tempos T7 e T21, o maior número de fêmeas alimentadas e vivas foi encontrado em G2 sendo que, em T7, G1 apresentou 6% e G2, 16%. Já no T21, as porcentagens de G1 e G2 foram, respectivamente, 7% e 10% (graf. 13).

Nos demais tempos (T30, T60 e T120) não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos.

Gráfico 12 – Média por grupo, por tempo, de fêmeas ingurgitadas e vivas

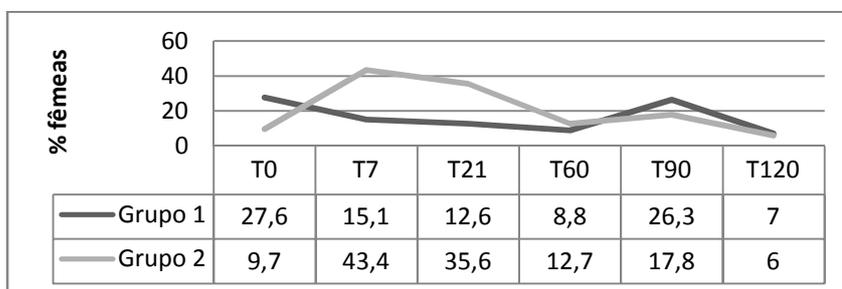
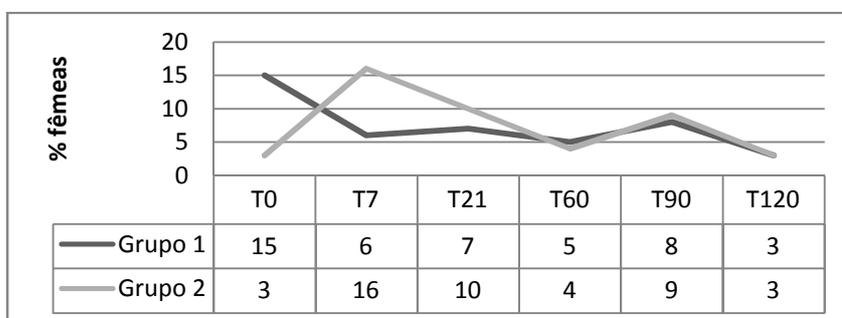


Gráfico 13 – Médias por grupo, por tempo, de fêmeas ingurgitadas e vivas após avaliação através do Qui-quadrado



3.3 – Hemograma

3.3.1 – Grupo 1

Foram observadas alterações estatisticamente significativas nos seguintes parâmetros e tempos, embora todos

estivessem ainda dentro dos limites da normalidade para a espécie:

a) Hemácias:

T0 - T1 ($p < 0,05$)

T0 - T2 ($p < 0,01$)

T0 - T4 ($p < 0,01$)

T0 - T8 ($p < 0,01$)

b) Hematócrito:

T0 - T1 ($p < 0,05$)

T0 - T2 ($p < 0,05$)

T0 - T4 ($p < 0,01$)

T0 - T7 ($p < 0,05$)

T0 - T8 ($p < 0,001$)

c) Hemoglobina:

T0 - T1 ($p < 0,05$)

T0 - T2 ($p < 0,05$)

T0 - T4 ($p < 0,01$)

T0 - T7 ($p < 0,05$)

T0 - T8 ($p < 0,001$)

d) CHCM

T0 - T3 ($p < 0,05$)

T0 - T5 ($p < 0,05$)

T1 - T3 ($p < 0,05$)

Os demais parâmetros (leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas) não apresentaram

diferenças estatisticamente significativas entre os tempos desse grupo (Gráfico 16 a 27).

3.3.2 – Grupo 2

O grupo não submetido a banhos quinzenais apresentou diferença estatisticamente significativa apenas nos

seguintes parâmetros e tempos, também com os valores dentro dos limites da normalidade para a espécie:

a) Hemoglobina

T0 – T3 ($p < 0,05$)

Gráfico 14 – Comparação do efeito inseticida entre G1 e G2

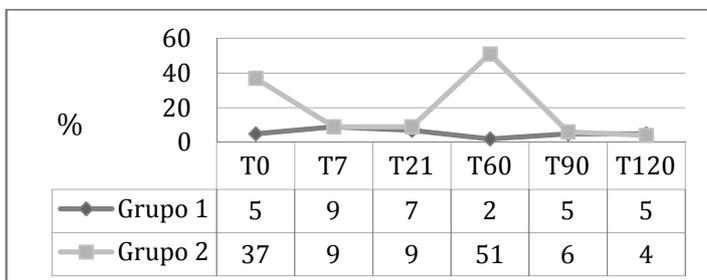
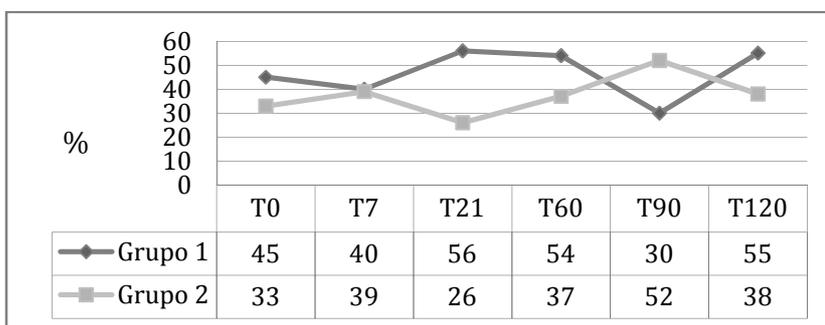


Gráfico 15 – Comparação do efeito repelência entre os grupos G1 e G2



b) VCM

T3 – T6 ($p < 0,05$)

Os demais parâmetros (leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas) não apresentaram

T3 – T7 ($p < 0,05$)

diferenças estatisticamente significativas entre os tempos desse grupo (Gráficos 16 a 27).

3.3.2 – Grupo 2

O grupo não submetido a banhos quinzenais apresentou diferença estatisticamente significativa apenas nos seguintes parâmetros e tempos, também

com os valores dentro dos limites da normalidade para a espécie (Gráficos 16 a 27):

a) Hemoglobina

T0 – T3 ($p < 0,05$)

Os demais parâmetros (leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos,

b) VCM

T3 – T6 ($p < 0,05$)T3 – T7 ($p < 0,05$)

eosinófilos e plaquetas) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos desse grupo.

3.4 – Bioquímica

3.4.1 - Grupo 1

Houve diferença estatística significativa nos seguintes parâmetros e tempos, embora

estejam ainda dentro dos limites da normalidade para a espécie:

a) ALT
 T0 - T8 ($p < 0,01$)
 T2 - T8 ($p < 0,05$)
 T4 - T8 ($p < 0,001$)
 T6 - T8 ($p < 0,01$)

b) Ureia
 T2 - T5 ($p < 0,05$)
 T2 - T6 ($p < 0,001$)
 T6 - T7 ($p < 0,05$)

c) Creatinina
 T1 - T8 ($p < 0,01$)
 T2 - T8 ($p < 0,01$)
 T4 - T5 ($p < 0,01$)
 T4 - T8 ($p < 0,001$)
 T6 - T8 ($p < 0,05$)
 T7 - T8 ($p < 0,05$)

Os demais parâmetros mensurados (AST, fosfatase alcalina, proteínas totais,

albumina, globulinas) não apresentaram diferença significativa (Gráficos 28 a 35).

3.4.2 – Grupo2

Ocorreu diferença estatística apenas no seguinte parâmetro e tempos, embora

estejam ainda dentro dos limites da normalidade para a espécie:

a) Ureia

T1 – T4 ($p < 0,01$)

T1 – T5 ($p < 0,01$)

Nos demais parâmetros (ALT, AST, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, globulinas e creatinina) não

houve diferença entre os tempos (Gráficos 28 a 35).

Gráfico16 - Médias do hematócrito(%) dos animais do grupo, por tempo.

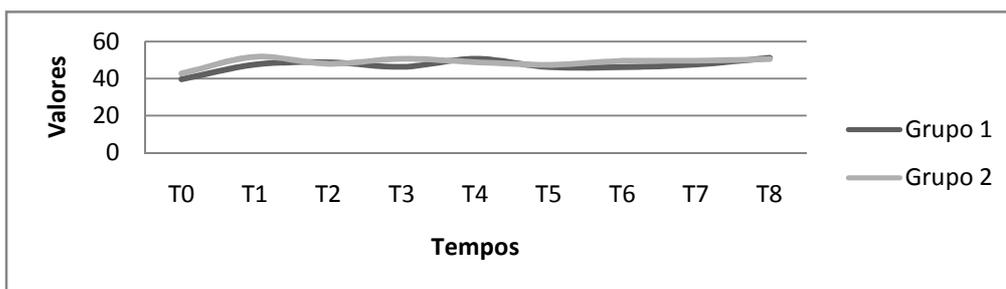


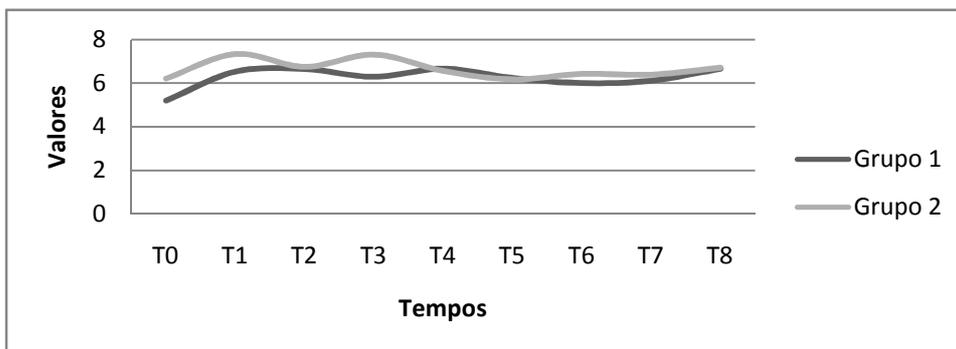
Gráfico 17 - Médias da contagem de hemácias(milhões /mm³) dos animais, por tempo.

Gráfico 18 - Médias da hemoglobina (g/dl) dos animais, por tempos.

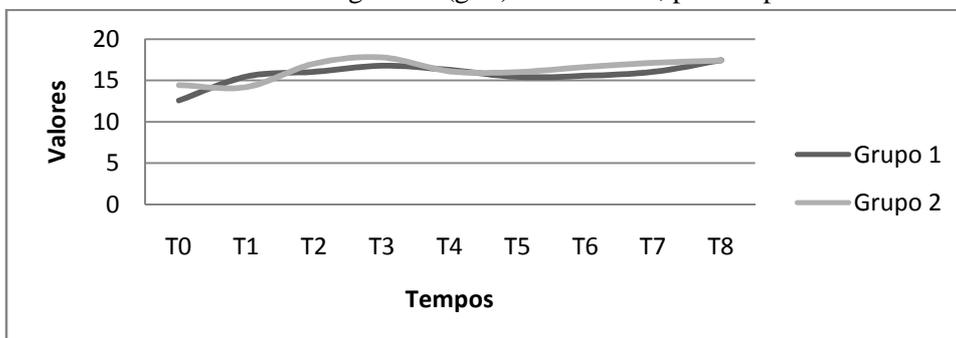


Gráfico 19 - Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fl) dos animais, por tempo.

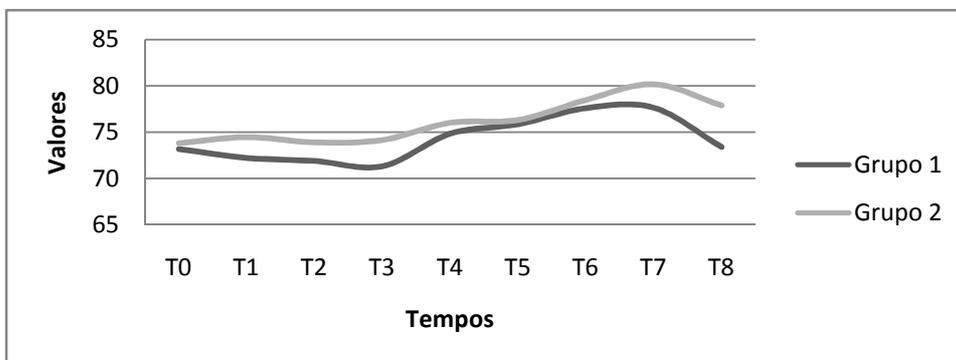


Gráfico 20 - Médias da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%), por tempo.

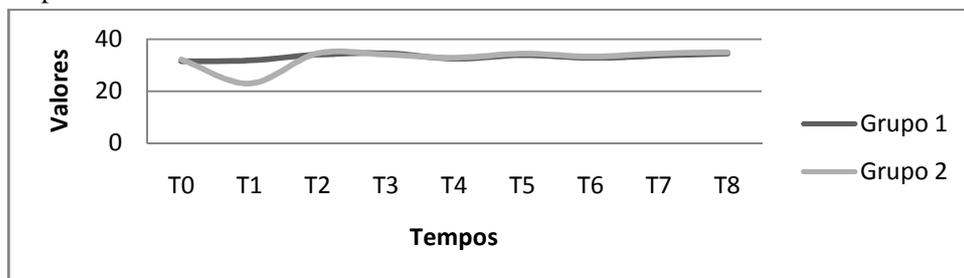


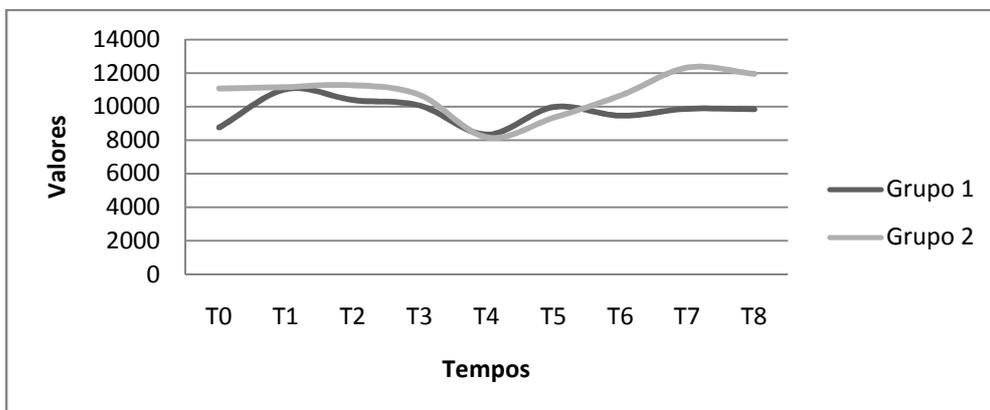
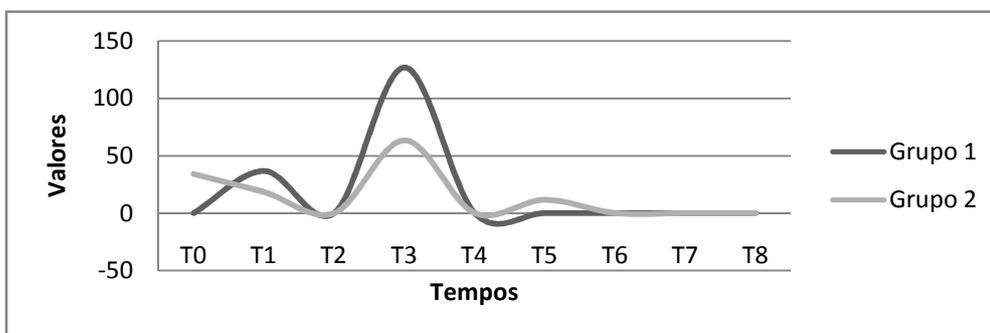
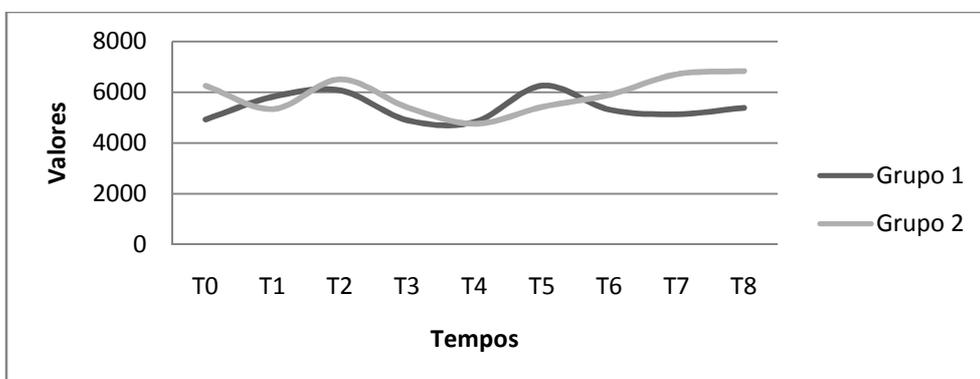
Gráfico 21 - Médias da contagem de leucócitos ($/\text{mm}^3$) totais, por tempo.Gráfico 22 - Médias da contagem dos neutrófilos bastonetes ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.Gráfico 23 - Médias da contagem dos neutrófilos segmentados ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.

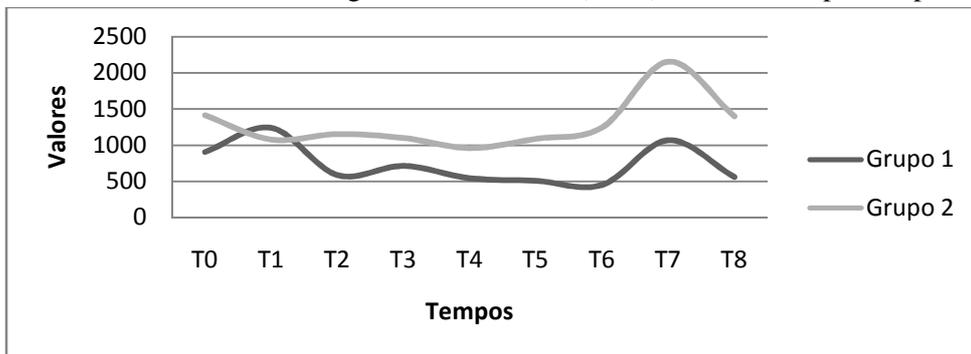
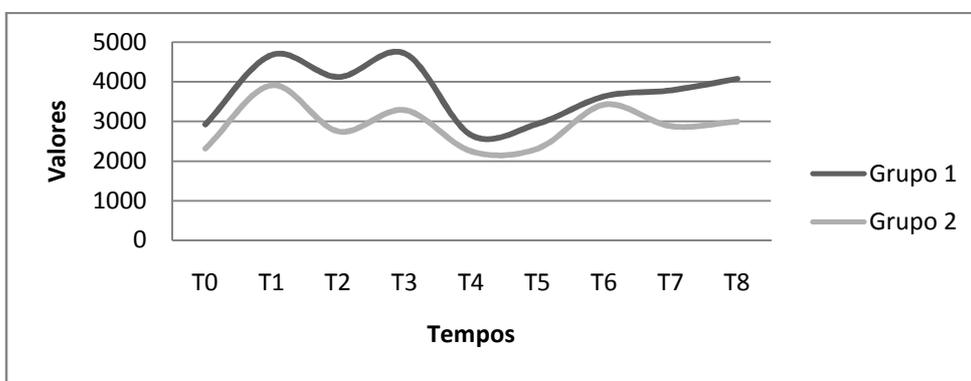
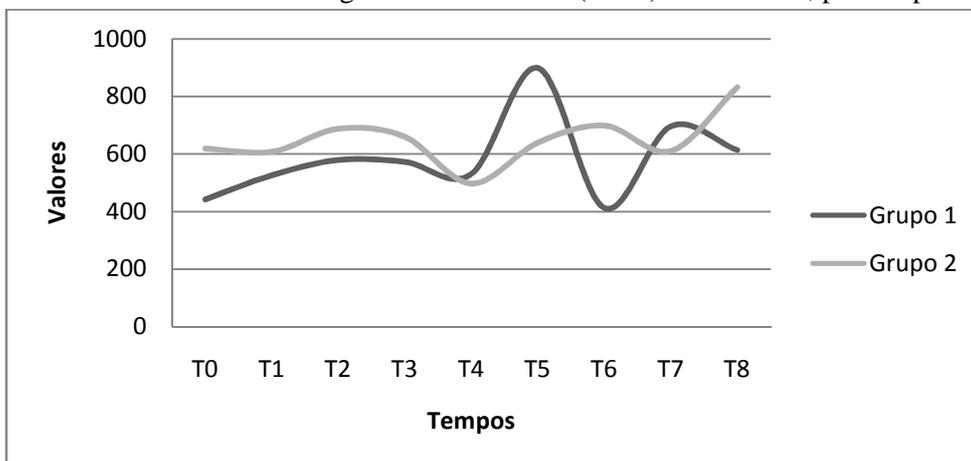
Gráfico 24 - Médias da contagem de eosinófilos ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.Gráfico 25 - Médias da contagem dos linfócitos ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.Gráfico 26 - Médias da contagem dos monócitos ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.

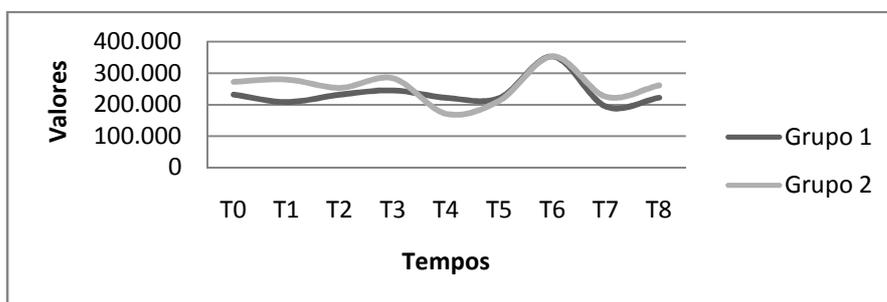
Gráfico 27 - Médias da contagem das plaquetas ($/\text{mm}^3$) dos animais, por tempo.

Gráfico 28 - Médias correspondentes às dosagens de ALT (mg/dL) dos animais, por tempo.

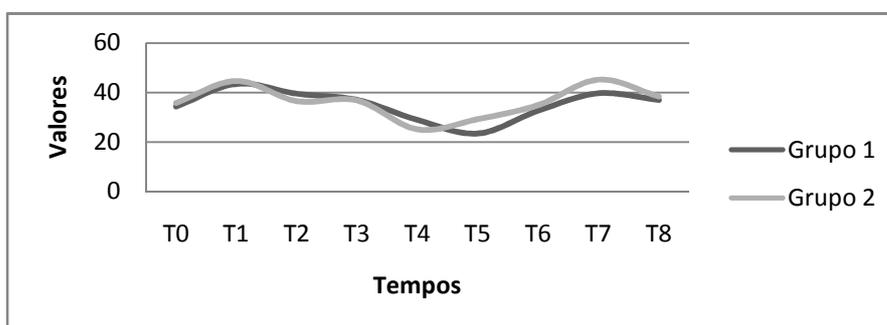


Gráfico 29 - Médias correspondentes às dosagens de AST (mg/dL) dos animais, por tempo.

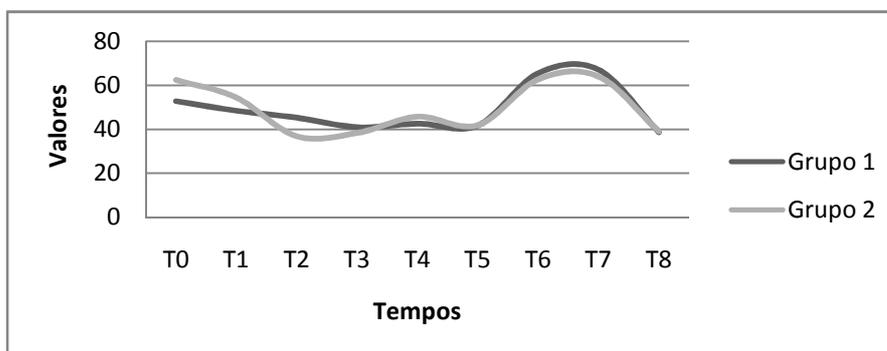


Gráfico 30 - Médias correspondentes às dosagens de FA (mg/dL) dos animais, por tempo.

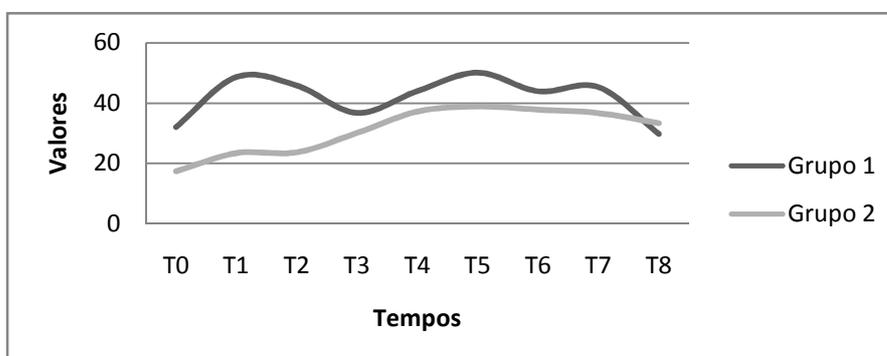


Gráfico 31 - Médias correspondentes às dosagens de proteínas totais (g/dL) dos animais, por tempo.

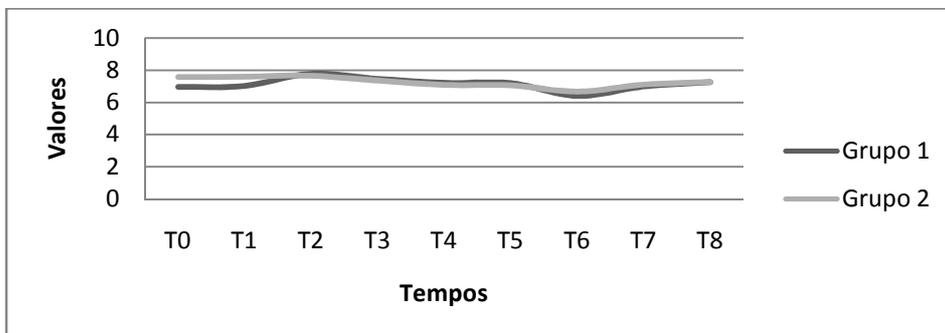


Gráfico 32 - Médias correspondentes às dosagens de albumina (g/dL) dos animais, por tempo.

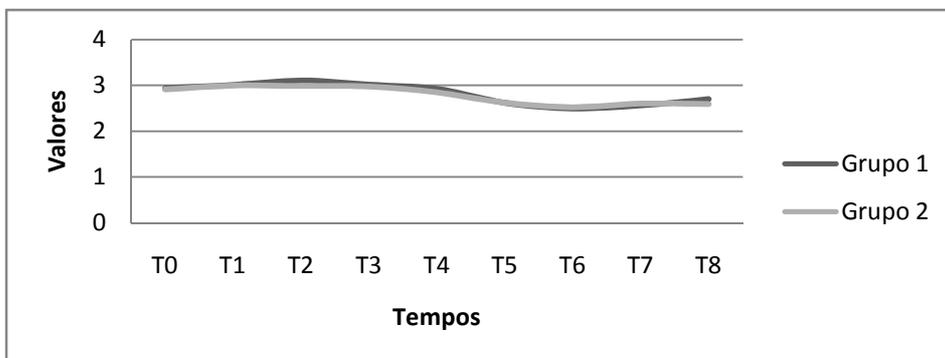


Gráfico 33 - Médias correspondentes às dosagens de globulina (g/dL) dos animais, por tempo.

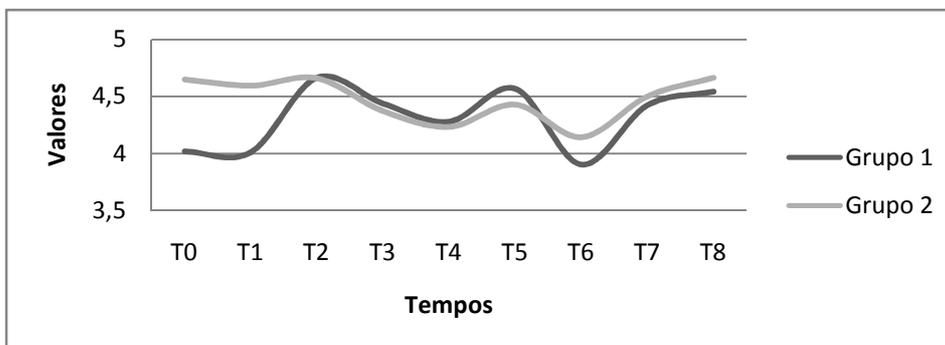


Gráfico 34 - Médias correspondentes às dosagens de ureia (mg/dL) dos animais, por tempo.

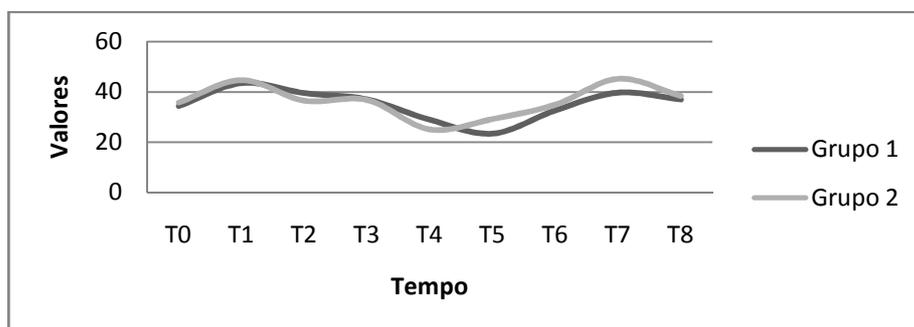
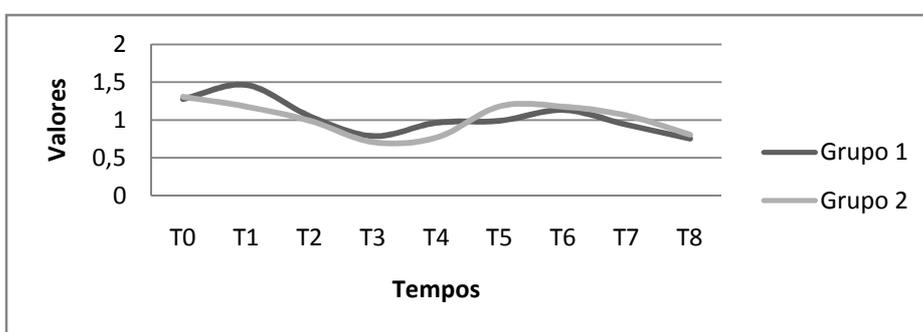


Gráfico 35 - Médias correspondentes às dosagens de creatinina (mg/dL) dos animais, por tempo.



4 – Discussão

A coleira impregnada com deltametrina 4% é utilizada como meio de prevenção da LV, demonstrada por diversos estudos realizados em diferentes países (MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002; REITHINGER et al., 2003; FERROGLIO et al., 2008). No estudo realizado por Mazloumi GavGANI et al (2002), no Irã, a soroconversão de crianças e cães foi avaliada em vilas nas quais todos os cães recebiam a coleira e em outras nas quais os cães não receberam a coleira. Nas vilas nas quais a coleira foi utilizada, houve redução significativa da soroconversão de crianças e cães. De acordo com os autores, a coleira

demonstra capacidade de proteger os cães e a comunidade, reduzindo o risco de infecção por *L. infantum*. Entretanto, a efetividade dependeria da importância dos reservatórios silvestres e do uso massivo pela comunidade (MAZLOUMI GAVGANI et al., 2002). De acordo com Reithinger et al. (2004), o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% pode ser uma alternativa ao extermínio de cães no Brasil, embora o impacto seria dependente da cobertura de uso e taxa de perdas.

Alguns autores relatam que elevada taxa de proteção só seria obtida com o uso da coleira em massa, em cães infectados ou

não, e não há proteção tão eficaz quando o uso é individual (MAROLI et al., 2001). Entretanto, a proteção individual do cão deve ser uma preocupação do médico veterinário e do proprietário devido à importância da patologia, uma vez que em grande parte dos casos seja fatal e que os proprietários optam muitas vezes pela eutanásia do animal. A importância da

doença na medicina veterinária é ofuscado pelo fato de cães serem os reservatórios de *L. infantum*, que causa a LV em humanos. Portanto, frequentemente as tentativas de controlar a doença em cães visam a redução do risco de infecção para o homem, ao invés de simplesmente protegerem os cães (KILLICK-KENDRICK et al., 1997).

4.1 – Comparação dos efeitos entre os tempos, por grupo

O G1 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tempos, enquanto o G2 apresentou diferenças apenas quando comparados o T21 e o T120. Os resultados do presente estudo não refletem aqueles dos outros trabalhos realizados com a coleira impregnada com deltametrina. No estudo de David et al. (2001), a mortalidade de flebótomos chegou a 96% (quarta semana) e caiu 35% na trigésima quinta semana, com redução gradual apenas após a vigésima segunda semana após a aplicação. Segundo outros autores, a coleira impregnada com deltametrina 4% apresentou mortalidade de 30% (REITHINGER et al., 2001). Após 8 dias de uso da coleira, Halbig et al. (2000) não observaram diferenças estatísticas entre os cães não tratados e os tratados, após 7 horas de exposição aos flebótomos. De acordo com Killick-Kendrick et al. (1997), não

houve diferença estatística na mortalidade de flebótomos entre os cães tratados e os não tratados após 7 dias de uso, resultado semelhante ao observado por Halbig et al. (2000).

Para o efeito repelência, o G1 apresentou diferença estatisticamente significativa apenas quando comparados os resultados do momento anterior à aplicação do tratamento (T0) e 120 dias após (T120), respectivamente, 71,1% e 94,3%. Para o G2, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos, incluindo T0. As taxas encontradas na literatura são variáveis. No estudo de Halbig et al. (2000), apesar do curto período de uso da coleira pelos cães, houve redução na alimentação dos flebótomos em torno de 80% , resultado distinto ao encontrado por David et al. (2001), quando a inibição da alimentação chegou a 100% após 8 a 12 semanas de utilização. De

maneira similar, o maior efeito repelência encontrado por Reithinger et al. (2001) foi após 8 semanas de utilização, embora em proporção menos expressiva (69%).

Todos os estudos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2001) utilizaram como gaiolas semelhantes à utilizada no presente trabalho, permitindo exposição de todo o corpo do animal aos flebótomos soltos em seu interior, embora apresentassem diferenças entre espécies utilizadas, se criadas em laboratório ou capturadas previamente ao experimento, entre o tempo de exposição. Apenas um estudo utilizou *L. longipalpis* obtidas de colônia fechada (DAVID et al., 2001), enquanto outros utilizaram vetores encontrados apenas no Velho Mundo, do gênero *Phlebotomus* (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; HALBIG et al., 2000; REITHINGER et al., 2001). Tal diferença pode refletir nos resultados observados, uma vez que espécies diferentes podem apresentar

comportamentos distintos de alimentação. Quando compara-se apenas o estudo (DAVID et al., 2001) que utilizou a mesma espécie que o presente trabalho, foram observadas diferenças expressivas nos resultados dos dois efeitos (inseticida e repelência) que podem ser devido a outros fatores referentes às metodologias, como tempo de exposição aos flebótomos. Quarenta minutos foi o tempo determinado para exposição dos cães aos flebótomos neste trabalho, enquanto em outros o tempo podia chegar a 7 horas (HALBIG et al., 2000; REITHINGER et al., 2001) ou 2 horas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001). Um tempo maior de exposição permite aos flebótomos mais oportunidades de alimentação, bem como mais contato com o agente utilizado nas coleiras, proporcionando provavelmente maior exposição e, portanto, efeitos mais expressivos que aqueles encontrados no presente estudo.

4.2 – Comparação entre os grupos G1 e G2

Não há, atualmente, nas bases de dados consultadas e na revisão bibliográfica realizada, trabalhos que avaliaram o desempenho da coleira impregnada com deltametrina 4% após banhos. Killik-Kendrick et al. (1997) considerou em sua

metodologia que os cães utilizados em seu estudo, por terem acesso à área externa, exposta às intempéries, estavam em condições semelhantes às enfrentadas por cães de caça, cães de guarda e outros que vivam em áreas externas. No presente

estudo, além do acesso às áreas externas e expostas às chuvas, os cães do G1 foram banhados com xampu neutro quinzenalmente; outros seis cães do G2 não foram banhados mas possuíam acesso a áreas externas. As condições às quais o G1 foi submetido podem ser consideradas mais naturais no cenário brasileiro atual, no qual os proprietários banham seus animais em intervalos quinzenais ou mesmo semanais. Quando comparados entre si, observou-se efeito repelência melhor no G1 que no G2; situação oposta para o efeito inseticida, no qual o G2 mostrou melhores resultados. A diferença nos resultados, com a repelência melhor no G1, pode ser devido a algum produto na composição do xampu auxiliando na repelência ou a redução das secreções e odores dos cães, retirados a cada banho, reduzindo a atratividade do cão para os flebótomos.

No período anterior à colocação da coleira impregnada com deltametrina 4% (T0), o G2 apresentou mortalidade significativamente maior que o G1. Os grupos foram expostos aos flebótomos em dias distintos, nos quais a condição de umidade e temperatura, as gerações de flebótomos distintas, podem ter exercido influência externa sobre o resultado obtido. Aos 21 e aos 60 dias de uso da coleira, obteve-se diferenças na mortalidade estatisticamente significativas, sendo que

no G2 as taxas foram de 9 e 51% e, no G1, de 7 e 2%, respectivamente. No estudo de Killick-Kendrick et al. (1997), o mesmo efeito variou de 25 a 64%, no período de duas a 34 semanas, resultados semelhantes aos observados nesse estudo. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos demais tempos avaliados, entre os grupos.

No efeito repelência, o G1 apresentou melhores resultados quando comparados os tempos 0, 7 e 21 (45%, 40% e 56%, respectivamente) aos respectivos do G2. Nos demais tempos, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Entretanto, a repelência máxima foi observada no T21, de 56%, resultado muito aquém do encontrado em outro estudo, no qual o valor foi de 96% (KILLICK-KENDRICK et al., 1997).

Algumas diferenças são encontradas quando este estudo e o de Killick-Kendrick et al. (1997) são comparados, dentre elas a espécie de flebótomo utilizada, *L. longipalpis* no presente estudo e *Phlebotomus perniciosus* no de Killick-Kendrick et al. (1997) e a diferença no período de exposição dos cães aos flebótomos: 40 minutos e 2 horas, respectivamente. Diferenças na biologia e comportamento de espécies distintas de flebótomos, assim como diferenças de temperaturas e umidades, podem

influenciar nas diferenças de resultados observados.

O banho e a exposição a agentes químicos pode reduzir em até 8% a eficácia da coleira, conforme Polonko (Comunicação Pessoal, 2012), a cada exposição a esses fatores. O G1 foi banhado a cada 15 dias e, no entanto, apresentou melhor capacidade em reduzir a alimentação das fêmeas que o grupo sem banho e pior desempenho no efeito inseticida, com menor número de flebótomos mortos quando comparado ao G2. Tal diferença entre os grupos pode significar que alguma substância adjuvante presente no xampu ou, ainda, a ausência de acúmulo de secreções e odores específicos dos cães que poderiam atrair os flebótomos,

4.3 – Efeito inseticida em fêmeas ingurgitadas

4.3.1 – Fêmeas ingurgitadas e mortas

Diversos estudos avaliaram a capacidade da coleira impregnada com deltametrina 4% de, falhando em impedir a alimentação da fêmea, causar sua morte (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2001). No presente estudo, não houve diferença estatística significativa entre os tempos do G1, mantendo pequena a taxa de fêmeas ingurgitadas e que morriam em seguida. No G2, no entanto, houve diferença entre os tempos T0 e T7, T7 e T21 e, por fim, T7 e

poderiam ser incriminados pelo aumento da repelência no grupo banhado. Outros estudos para elucidar se há essa influência e, se houver, qual o responsável, são necessários. As diferenças observadas entre os grupos podem significar que a coleira impregnada com deltametrina possui seu efeito inseticida perde-se mais facilmente com a exposição a agentes químicos com frequência. A diminuição do efeito inseticida foi mais rápida que a da repelência, conforme observado por David et al. (2001). Os mesmos autores relatam que, aparentemente, para a repelência há necessidade de menor quantidade de piretroide que para o efeito inseticida.

T60. Os tempos T0, T21 e T60 não apresentaram fêmeas ingurgitadas e mortas. Os resultados obtidos demonstram pequena associação entre os efeitos, diferente do que outros autores observaram. Nas primeiras 16 semanas, 100% das fêmeas ingurgitadas morreram, com queda para 35% após 35 semanas (DAVID et al., 2001). Reithinger et al. (2001) relatou que houve ação combinada estatisticamente significativa entre os efeitos no primeiro e segundo meses após a colocação da coleira, quando

comparados a outros inseticidas como a permetrina e o fention. Para Killick-Kendrick et al. (1997), as poucas fêmeas que sobreviveram em seu estudo após terem se alimentado provavelmente não tiveram contato com o inseticida. Os autores sugerem que isso pode ter ocorrido caso as fêmeas tenham se alimentado na língua dos cães, expostas na exposição para garantir a patência das vias respiratórias. No estudo ora realizado, os cães foram sedados mas não permaneciam com a língua pendente durante o período da exposição, podendo os insetos terem sido expostos ao princípio ativo mas não sofreram qualquer dos efeitos (repelência ou inseticida).

De acordo com David et al. (2001) em seu estudo, a circulação do parasita no ciclo de

4.3.2 – Fêmeas ingurgitadas e vivas

Conforme exposto nos resultados, apenas T0, T7 e T21 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0005$). No momento T0, antes da colocação da coleira, G1 apresentou maior relação de fêmeas alimentadas e sobreviventes, enquanto nos demais tempos T7 e T21, nos momentos determinados pelo fabricante como início e pico de ação, respectivamente, G2 manteve mais fêmeas ingurgitadas e vivas. Nos demais momentos, os dois grupos apresentaram resultados semelhantes e não

transmissão pode ser reduzida de maneira significativa quando o cão é o principal reservatório pois apenas 1% das fêmeas de flebótomos que se alimentaram, sobreviveram.

Entre os grupos, não houve diferença estatística significativa quando comparados nos tempos 7, 21, 90 e 120. No T60, não foi possível realizar o Qui-quadrado pois não havia qualquer fêmea ingurgitada e morta nos dois grupos, deixando uma das colunas em branco. Já no T0, houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o grupo 1 e grupo 2 (19 e 0%, respectivamente), embora nesse momento os cães ainda não usassem a coleira impregnada com deltametrina.

estatisticamente significativos (Gráficos 12 e 13).

Diferente do exposto por David et al. (2001), mais de 1% de fêmeas sobreviveram em todos os tempos, prejudicando a capacidade da coleira impregnada com deltametrina 4% em promover adequada proteção individual ao cão, além de não impedir adequadamente a circulação do parasito no ciclo de transmissão.

Outros estudos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; REITHINGER et al., 2001)

possuem resultados distintos ao observado no presente trabalho, no qual houve maior porcentagem de fêmeas sobreviventes e ingurgitadas. Embora nos tempos 60, 90 e 120 não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, o número de fêmeas vivas e ingurgitadas compromete a

4.4 – Exames laboratoriais

Os resultados de hemograma e bioquímica dos cães dos dois grupos não apresentaram alterações, em sua média, em relação aos valores normais para a espécie (Anexo 6; Gráficos 13 a 32).

Não há teste diagnóstico ou alteração característica que possa confirmar a intoxicação de cães por piretroides ou piretrinas. Através da exposição dérmica, o principal efeito adverso observado é a parestesia, presumivelmente por hiperatividade das fibras nervosas sensoriais cutâneas. Em exposições

segurança do cão. Em nenhum momento não houve, em qualquer um dos grupos, mortalidade de 100% ou de 1% das fêmeas expostas e ingurgitadas, conforme relatam Reithinger et al. (1997) e David et al. (2001), respectivamente (Gráfico 13).

crônicas em experimentos, foram observados mialgia, astenia, irritação dérmica e o desenvolvimento de ansiedade e irritabilidade (ANADÓN et al., 2009). Os animais do presente estudo não apresentaram sinais adversos durante todo o período experimental, demonstrando ser um produto seguro para utilização. A ausência de alterações laboratoriais confirma a segurança do uso de deltametrina em cães que, conforme literatura é um piretroide com reduzida toxicidade para essa e outras espécies (ANADÓN et al., 2009).

5 – Conclusões

1 – A coleira impregnada com deltametrina 4% apresenta diminuição do efeito inseticida em animais banhados (G1) quinzenalmente, além do mesmo não ter sido significativo ao longo do período de estudo. A redução do efeito inseticida também compromete a capacidade da

coleira impregnada com deltametrina 4% em causar a morte de fêmeas ingurgitadas.

2 – No G2, não foram observados resultados significativos para a repelência, e reduzido efeito inseticida por todo o período de experimentação

3 – A sobrevivência de fêmeas ingurgitadas compromete a proteção individual do cão pois não há interrupção do ciclo de transmissão entre o flebótomo e o cão. Deste modo, um cão que utiliza a coleira impregnada com deltametrina 4% ainda pode ser picado pelo flebótomo e transmitir ou infectar-se com a doença. Há comprometimento na proteção individual do cão que utiliza a coleira e de cães que não a utilizam, uma vez que um flebótomo infectado e sobrevivente pode transmitir aos outros a doença em um repasto sanguíneo.

4 – A coleira impregnada com deltametrina 4% não apresentou curva previsível em nenhum dos efeitos estudados, com resultados inconsistentes durante o período de estudo.

5 – Os cães não apresentaram efeitos adversos ou alterações laboratoriais com o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% durante o período do experimento.

6 – Há necessidade de estudos de outros métodos de prevenção da doença para assegurar a proteção individual do cão, uma vez que o uso da coleira impregnada com deltametrina 4% não demonstrou efeitos repelência e inseticida consistentes.

CAPÍTULO 4: Avaliação dos efeitos inseticida imediato e repelência da permetrina 65% e de sua associação com deltametrina 4% sobre flebotomíneos transmissores da leishmaniose visceral canina

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial podendo ser causada por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil o agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (GONTIJO e MELO, 2004).

A LV é transmitida por fêmeas de dípteros pertencentes à família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. As espécies transmissoras são a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que no Brasil a transmissão pela *L. longipalpis* é a mais importante por ser a espécie predominante nos focos da doença no país (BELAVILACQUA, 1999; GONTIJO e MELO, 2004).

Endêmica em mais de 70 países, a LV está presente em regiões do sul da Europa, África, Ásia, Américas do Sul e Central e Estados Unidos. Com mais de 350 milhões de pessoas em risco e incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano, a doença também é uma preocupação importante em países não endêmicos, onde cães importados doentes ou infectados podem constituir problema saúde veterinária e pública (SOLANO-GALLEGO et al. 2009).

A LV inicialmente possuía caráter eminentemente rural e, mais recentemente expandiu-se para as áreas urbanas de médio

e grande porte. A doença apresenta ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul. A partir dos anos 90, os estados como o Pará, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo passaram a influenciar significativamente nas estatísticas da doença no Brasil (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL, 2006). A LV é uma enfermidade emergente com aumento significativo do número de casos e elevada letalidade, podendo afetar crianças desnutridas, idosos e pessoas portadoras do vírus da Imunodeficiência Adquirida. Por tais motivos, a criação do programa nacional de controle da leishmaniose visceral foi necessária (GONTIJO e MELO 2004; BRASIL, 2006).

A Região Metropolitana de Belo Horizonte apresentou uma expansão de casos da LV, introduzida a partir de um município vizinho com aumento do número de casos humanos e caninos, ilustrando desta forma o processo de urbanização da doença (GONTIJO e MELO, 2004; COSTA VAL, 2004).

O cão (*Canis familiaris*) é uma das principais fontes de infecção na área urbana, sendo importante alvo nas estratégias de controle, uma vez que a infecção em cães é mais prevalente do que

no homem. Já os reservatórios no ambiente silvestre são os marsupiais (*Didelphis albiventris*) e as raposas (*Dusicyon Vetus* *Cerdocyon Thous*) (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL, 2006).

A utilização de produtos à base de permetrina aplicados diretamente nos cães têm demonstrado elevada capacidade letal e repelente para flebótomos durante períodos de 15 a 30 dias; entretanto sua efetividade depende da adesão do proprietário, pois requer reaplicações frequentes. Como medida de saúde pública, a aplicação de produtos a base de permetrina nos animais, a cada 15 a 30 dias, torna-se inviável (CAMARGO-NEVES et al., 2004). No Brasil, estudos concluíram que a utilização de coleiras com deltametrina a 4% é mais

efetiva que a eutanásia de cães soropositivos, (CAMARGO-NEVES et al., 2005; GLASSER, 2005)

Objetivou-se, através deste trabalho, avaliar a eficiência repelente e inseticida da permetrina 65% em aplicações consecutivas por 3 meses e a sua associação com a coleira impregnada com deltametrina 4%.

Considerou-se, no presente estudo, que o efeito repelência é definido pela capacidade do produto em impedir a alimentação de fêmeas de flebótomos e, o inseticida, a capacidade em matar flebótomos machos e fêmeas, ingurgitadas ou não. Para este trabalho, considerou-se que fêmeas ingurgitadas e mortas encaixavam-se apenas no efeito inseticida.

2. Material e métodos

Os procedimentos com os cães foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade

Federal de Minas Gerais (CETEA UFMG processo n° 315/2012).

2.1 – Animais

Para este experimento foram utilizados oito cães sem raça definida, machos e fêmeas, castrados e com o peso médio de dez a 15kg.

Os cães foram mantidos em canis individuais, com abrigo contra as intempéries e com área descoberta para exercícios e descanso. Foram submetidos a enriquecimento ambiental através do uso de ossos de raspa de couro, escovações, passeios e brincadeiras.

A alimentação (Pedigree Adultos Carne e Vegetais® Mars) e água eram fornecidas à vontade e o ambiente mantido limpo diariamente.

Previamente ao início do experimento, todos os cães foram submetidos a exame físico completo, hemograma e provas bioquímicas de função renal e hepática para assegurar sua saúde. Todos eram soronegativos nos exames de Leishmaniose, em ambas as técnicas empregadas (RIFI e ELISA).

2.2 – Flebotomíneos

Foram utilizados machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de uma colônia fechada do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A colônia foi iniciada com exemplares capturados na cidade de Piauí, Teresina, Brasil. Eram mantidos em gaiolas do tipo

CDC e alimentados com solução glicosada, em um ambiente com temperatura e umidade controladas. As fêmeas realizavam o repasto sanguíneo em hamsters previamente anestesiados. Os insetos foram criados segundo a metodologia e condições descritas por Modi e Tesh (1983) e Gontijo (Comunicação pessoal, 2001).

2.3 – Inseticidas

Foram utilizados dois produtos com capacidades inseticida e repelente à base de piretroides sintéticos.

O primeiro produto era a base de permetrina 65% de uso tópico para cães, apresentado como repelente do flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, contra ctenocafalidiose e infestação por carrapatos. Era aplicado na pele dos cães após os pelos terem sido afastados. A reaplicação ocorria após 30 dias. Se o cão possuía mais que 15 kg, duas pipetas eram utilizadas conforme recomendações do fabricante.

Utilizou-se também uma coleira impregnada com deltametrina 4% (2 ou 12), que consistia de uma faixa branca de 65cm de comprimento, constituídas de polivinilclorido (PVC) e impregnadas com 40mg/d de deltametrina. Foram colocadas de acordo com a recomendação dos fabricantes, deixando um espaço de dois dedos entre a coleira e o pescoço do animal. O excesso de coleira era cortada a uma distância de 5cm da trava.

2.4 – Gaiola para exposição dos cães aos flebotomíneos

Para alimentação nos cães, os flebotomíneos foram soltos em uma gaiola idealizada para este experimento. A gaiola consistia em uma armação de metal em formato retangular, com 70 cm de altura, 70cm de largura e 180 cm de comprimento. Preso à armação em suas extremidades, havia uma câmara feita com tecido tule liso tradicional nas mesmas medidas da armação de metal. Porém, a extremidade

direita era fechada com zíper e possuía uma extensão de tecido de 50 cm que permitia seu fechamento por um cordão de tecido. Na extremidade esquerda havia também uma extensão de tecido de 50 cm que era fechada por um cordão após posicionamento dos cães e antes da liberação dos flebotomíneos, de modo a impedir fugas. Na lateral foram feitas duas mangas para o exterior, de 7cm de

diâmetro, para que o interior da gaiola pudesse ser acessado sem risco de fuga de flebotomíneos.

2.5 – Tratamentos

Os cães foram expostos aos flebótomos nos seguintes momentos:

T0 – Antes da aplicação do medicamento a base de permetrina 65%;

T30 – 30 dias após a primeira aplicação do produto a base de permetrina 65%;

T60 – 30 dias após a segunda aplicação do produto a base de permetrina 65%;

T90 – 30 dias após a terceira aplicação do produto a base de permetrina 65%;

T111 – 21 dias após a associação da quarta aplicação a base de permetrina 65% com a coleira impregnada com deltametrina 4%.

Após cada exposição dos cães aos flebótomos, os animais recebiam a aplicação de nova dose de permetrina 65% de acordo com o peso e a recomendação do fabricante. Deste modo, em T0 os cães receberam a primeira aplicação da permetrina 65%; em T30 receberam a a

segunda aplicação; em T60, a terceira aplicação e, em T90, receberam a quarta e última aplicação do produto. No T90, após a aplicação de permetrina a coleira impregnada com deltametrina 4% foi colocada nos animais.

2.5.1 – Procedimento de sedação e exposição dos cães aos flebótomos

Os cães foram sedados com a associação de acepromazina 0,2% (Aceprom 0,2%® Vetnil) na dose de 0,05mg/kg e cloridrato de petidina 50mg/ml (Cloridrato de Petidina® ampola de 2ml com 100mg União Química) na dose de 5mg/kg, por via intra-muscular.

Após a sedação, os cães eram posicionados em decúbito lateral direito no interior da gaiola para exposição e os flebótomos soltos no interior da gaiola. Permitiu-se o contato entre cães e insetos durante 40

minutos, em ambiente com redução de luminosidade. Após este período, os flebótomos foram aspirados com auxílio de um aspirador de carro de baixa potência, adaptado com uma extensão de cano de PVC de 30cm. Foram soltos em uma miniatura de armadilha CDC e posteriormente congelados. Após a aspiração de todos os flebótomos vivos e sua soltura na armadilha, o cão teve seu pelame aspirado, bem como o chão da gaiola adaptada, para recolhimento dos

flebótomos mortos. O cão foi retirado e, após recuperação da sedação, levado de volta ao canil individual.

2.6 – Classificação dos flebotomíneos

Os insetos foram separados entre vivos e mortos, machos e fêmeas e, entre as fêmeas, ingurgitadas ou não ingurgitadas.

Os flebótomos mortos recolhidos e contados, e os resultados eram registrados em planilha apropriada, correspondente ao tempo realizado na ocasião (Anexos 8 e 9).

Os flebótomos vivos e aspirados foram congelados previamente à classificação,

realizada em machos, fêmeas ingurgitadas ou não. A contagem final foi registrada em planilha apropriada, correspondente ao tempo realizado (Anexos 8 e 10).

Foram consideradas ingurgitadas as fêmeas que possuíam qualquer quantidade de sangue em seu abdome, visualizado com auxílio de um estereoscópio (fig. 7, 8, 9, 10 e 11).

2.7 – Análises estatísticas

Para verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov e Smirnov.

Os dados paramétricos foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste Tukey-Kramer. Realizou-se também o teste t pareado.

3. Resultados

3.1 – Efeito inseticida da permetrina 65%

De acordo com os resultados das análises estatísticas realizadas, houve diferença significativa ($p < 0,01$) quando o efeito inseticida do T0 foi comparado ao efeito no T60, demonstrando que no segundo mês consecutivo de aplicação do produto houve aumento significativo na mortalidade de flebótomos, o que não ocorre após a primeira aplicação (T30). Houve diferença ainda mais estatisticamente significativa

($p < 0,001$) quando comparados o T0 ao T90, demonstrando novamente que o uso consecutivo do produto permetrina 65% determina melhora em sua eficácia. Entretanto, quando comparados os efeitos entre os tempos T30, T60 e T90 entre si, não foram observadas diferenças significativas no poder inseticida do produto (Gráfico 36; Anexo 11).

3.2 – Efeito repelência da permetrina 65%

Como observado anteriormente, no efeito inseticida, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

quando comparado o T0 ao T90, sem resultados significativos quando outros

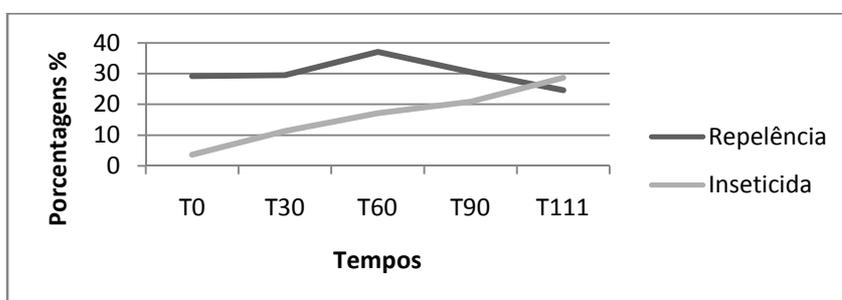
tempos foram comparados entre si (Gráfico 36; Anexo 11)

3.3 – Associação da coleira impregnada com deltametrina 4% aos animais em uso de permetrina 65%

Após a associação da coleira impregnada com deltametrina 4% aos cães que utilizaram permetrina 65% nos 3 meses anteriores, verificou-se por meio do teste t pareado que a diferença na eficácia nos

efeitos repelência e inseticida no T90 não diferiram significativamente dos efeitos obtidos no T111, correspondente a 21 dias após a aplicação da coleira.

Gráfico 36 – Médias(%) relativas aos efeitos inseticida e repelência.



4. Discussão

Poucos estudos foram desenvolvidos para testar a eficácia dos efeitos repelência e inseticida da aplicação tópica de permetrina 65% (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012) e alguns atestam sua eficácia como meio de redução de infecção em áreas endêmicas (GIFFONI et al., 2002; FERROGLIO et al., 2008).

Todos os estudos que avaliaram os efeitos inseticida e da permetrina 65% (MOLINA et al., 2001; REITHINGER et al., 2001; MOLINA et al., 2012) demonstraram eficiência. Entretanto, dois deles utilizaram a espécie *Phlebotomus perniciosus* obtidos em colônias de laboratórios (MOLINA et al., 2001; MOLINA et al., 2012) e um deles utilizou a espécie *Lutzomyia intermedia* capturada do ambiente. O presente trabalho

utilizou fêmeas e machos de *Lutzomyia longipalpis* obtidos em uma colônia laboratorial. Entretanto, todos os cães foram expostos aos flebótomos da mesma maneira, através de uma gaiola específica para esse fim, porém, o período de exposição variou de 40 minutos como no presente estudo, 1 hora (MOLINA et al., 2001; MOLINA et al., 2012) e 7 horas (REITHINGER et al., 2001).

Molina et al. (2001) obteve 78,5% de repelência no dia 7, variando em seguida de 0 a 42,1% do dia 14 ao dia 91. No estudo de Reithinger et al. (2001), não houve diferença significativa na taxa de alimentação dos flebótomos no dia 7, quando comparados aos controles, embora houvesse sugestão de redução na

alimentação de fêmeas expostas a cães tratadas com permetrina 65%. A repelência foi maior nos cães tratados com permetrina 65% no primeiro mês, com decréscimo significativo ao final do segundo mês. Já em outro estudo, obteve-se proteção considerada aceitável até o dia 22 (67,6%), tendo sido percebido efeito repelente até o dia 36 e ausência de efeito significativo no dia 43 (MOLINA et al., 2012). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na repelência quando comparados T0 (29,1%) e T60 (37,0%). Entretanto, no presente estudo, não houve a classificação das fêmeas mortas em alimentadas e não alimentadas. Esse fato pode ter ocasionado em um efeito repelência superestimado, uma vez que fêmeas alimentadas e mortas foram classificadas apenas como mortas.

A mortalidade dos flebótomos – dito efeito inseticida – no dia 7 foi de 100% e, no dia 28, foi de 91,8%, embora sua eficácia reduza gradualmente até atingir 42,2% no dia 91 (MOLINA et al., 2001). Em um estudo mais recente, demonstrou-se queda rápida no efeito para 43,2% após 15 dias de

uso, embora ainda houvesse diferença significativa até o dia 36 em relação ao grupo controle (MOLINA et al., 2012). De acordo com Reithinger et al. (2001), o efeito inseticida foi significativamente aumentado em 11% após uma semana de uso e em 33% após um mês, sem efeito significativo após 2 meses. O presente estudo observou que houve diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados o T0 (3,6%) ao T60 (17,1%) e entre T0 e o T90 ($p < 0,001$), respectivamente, 3,6% e 20,8%. Entretanto, não houve diferença no efeito após a colocação da coleira impregnada com deltametrina 4%, com o teste realizado 21 dias após sua colocação.

Não há, na literatura, estudo que compare a associação da permetrina 65% e da coleira impregnada com deltametrina 4%, o que dificulta discussões. Percebeu-se, entretanto, que mesmo aos 21 dias, momento em que o fabricante da coleira alega ser aquele de maior magnitude do efeito inseticida e do efeito repelência, não houve aumento significativo na repelência ou mortalidade dos flebótomos expostos aos cães tratados.

5. Conclusões

1 – A permetrina 65% apresenta efeito inseticida crescente, apesar de não estatisticamente significativa, com aplicações consecutivas por 3 meses.

2 – O efeito repelência manteve-se com pouca variação durante a aplicação consecutiva por 3 meses.

3 – A associação do uso de permetrina 65% com a coleira impregnada a deltametrina 4% não demonstrou elevações nos efeitos inseticida e repelência..

4 – São necessários aprimoramentos dos produtos testados para maior eficiência no efeito repelência e inseticida, visando a proteção individual do cão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leishmaniose visceral canina possui grande importância na clínica médica, uma vez que compromete a saúde dos cães por ser uma doença invariavelmente fatal. Poucos métodos de prevenção individual desses cães foram desenvolvidos e estudados, destacando-se entre eles, o uso de piretroides sintéticos em forma de “*pour on*” ou em coleiras impregnadas.

No presente estudo a permetrina 65%, piretroide sintético utilizado como repelente e inseticida dos flebótomos transmissores da doença demonstrou que seu uso pode ser viável para proteção individual do cão. Os efeitos repelência e inseticida evidenciaram eficácia crescente quando aplicados em três meses consecutivos, embora os resultados não fossem estatisticamente significativos. Durante todo o período de uso e monitoração, o efeito repelência apresentou-se com pouca variação ao longo do período.

Também de acordo com o estudo aqui exposto, as coleiras impregnadas com deltametrina 4% utilizadas por 4 meses não apresentam efeitos repelência e inseticida satisfatórios. O produto demonstrou ser

seguro para uso em cães, não apresentando alterações em exames laboratoriais ou efeitos adversos nos animais. Destaca-se a importância da queda do efeito inseticida em animais submetidos a banhos quinzenais, fato que compromete a proteção individual dos animais. No Brasil, há o hábito cultural de banhar os animais a cada semana ou no máximo quinzenalmente. Tais animais que utilizam a coleira impregnada com deltametrina 4% possuem sua proteção comprometida devido à redução da eficácia inseticida do produto, conforme observado no presente estudo.

Quando associada à permetrina 65%, a coleira impregnada com deltametrina 4% não proporcionou melhora dos efeitos repelência e inseticida, em relação ao fornecido pelo uso da permetrina 65% isoladamente.

Concluindo, nas condições experimentais do presente estudo, os produtos utilizados para proteção individual dos cães não apresentaram resultados satisfatórios. O uso conjunto de outras medidas pode ser necessário visando melhor proteção dos cães.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C. et al. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)

populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 2012.

- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomines sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, p.1-18, 2003.
- ANÁDON, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTINEZ, M.A. Use and abuse of pirethrin sandsyn the ticpyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, v. 182, p.7-20, 2009.
- ANTONIOU, M.; MESSARITAKIS, I.; CHRISTODOULOU, V. et al. Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. *Emerging infectious diseases*, v.15, p. 932-934, 2009.
- AUGUST, K. D. The responsibilities of pet ownership. In: DAVIS, R. D. *Caring for family pets: choosing and keeping our companion animals healthy*. Santa Barbara, Califórnia: Preager, 2011. pp. 17 – 28.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and the cat*, St Louis: Elsevier, 2006.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, v.24, n.7, 324-330, 2008.
- BEVILACQUA, P. D.; PAIXAO, H.H; MODENA, C.M. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <<www.scielo.br/pdf/icse/v4n7/07.pdf>>.
- BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, v. 162, p. 108-120, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRAZIL, R.P.; GOMES BRAZIL, B. Biologia dos flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E.F; LAINSON, R. (orgs). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 257 – 274, 2003.
- BRAZIL, R.P.; MORTON, I.E.; WARD, R.D. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (N) whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Ceará state, northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, 1991, p.497-98.
- CAMARGO NEVES, V.L.F. Avaliação da efetividade da utilização da coleira impregnada com deltametrina para controle da leishmaniose visceral no estado de SP. *BEPA*, v.12, p. 14-15, 2004.
- CIAMARELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium*, v.25, n.5, p.358-369, 2003.
- CLABORN, D. M. The biology and control leishmaniasis vectors. *JGlobInfectDis*, v.2, n.2, p.127-134, 2010.
- COSTA VAL, A. P. *Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas*. 2004. 125f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- COSTA VAL, A.P.;CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F.et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*,v.174, n. 3, 636 – 643, 2007.

- COURTENAY, O.; QUINNEL, R.J.; GARCEZ, L.M. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, p.1314 – 1320, 2002.
- COURTENAY, O.; KOVACIC, V.; GOMES, A.F et al. A long lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, p. 245 – 256, 2009.
- DAVID, C. The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2.2, 2010.
- DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S. et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.6, p.839 – 847, 2001.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, p.125-130, 1996.
- ELNAIEM, D.A.; WARD, R.D.; YOUNG, P.E. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasitol Resv.*, n. 80, p.414-419, 1994
- ENSLEY, S. M. Pyrethrins and pyrethroids. In: GUPTA, R.C. (ed.) *Veterinary toxicology*. Londres: Elsevier, 2012, p. 591 – 595.
- FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGGIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, v.55, p.145–148, 2008.
- FRANC, M.; BOUSHIRA, E. Efficacy of a combination of a fipronil-(S)-methoprene spot on formulation and a deltamethrin-impregnated collar in controlling fleas and sandflies on dogs. *Veterinary therapeutics*, v.10, n. 1-2, p.71-77, 2009.
- FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; NETO, B.E.L. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.45, n.1, p.24-29, 2012.
- GFELLER, R.; MESSONIER, S. *Manual de toxicologia e envenenamento em pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2006. 376p.
- GIFFONI, J.; ALMEIDA, C.; SANTOS, S. et al. Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis effect on disease prevalence and the vectors (Diptera Psychodidae) in a hyperendemic area. *Veterinary therapeutics*, v.3, n.4, 2002.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, n. 181, p.23-30, 2011.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, v.35, p.1169 – 1180, 2005.
- HALBIG, P.; HODJATI, M.H; MAZLOUMI-GAVGANI, A. S. et al. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protects domestic dogs from sandflies bites. *Med Vet Entomol.*, v.14, p.223-226, 2000.

- KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK M.; FOCHEUX C. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.11, p.105–111, 1997.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin. Dermatol.*, v. 17, n. 3, p. 279-89, 1999.
- LACERDA, M.M. The Brazilian Leishmaniasis control program. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 489-495, 1994.
- LOSS, L.D.; MUSSI, J.M.S.; MELLO, I.N.K. et al. Posse responsável e conduta de proprietários de cães no município de Alegre – ES. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 6, n.2, p. 105 – 111, 2012.
- LUCIENTES, J. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor® Protection Bands: preliminary results. In: Killick-Kendrick, R. *Canine leishmaniasis: an update*. Wiesbaden: *Hoechst Roussel Vet.*, 1999. p. 92-4.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, v. 158, p. 274-287, 2008.
- MAURICIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*. v.122, p.393-403, 2001.
- MAZLOUMI GAVGANI, A.S.; HODJATI, M.H.; MOHITE, H. et al. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *The Lancet*, v.360, p.374-379, 2002.
- MERCIER, P.; JASMIN, P.; SANQUER, A. Prevention of sand fly attack by topical application of a permethrin/pyriproxyfen combination on dogs. *Veterinary therapeutics*, v.4, n.3, 2003.
- MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; MATEO, M. et al. Evaluation of efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet parasitol*, v.143, p.375-379, 2007.
- MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G. et al. Canine leishmaniasis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in parasitology*, v. 24, n.8, p. 371-377, 2008.
- MODI, G. B.; TESH, R.B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.*, vol.5, n.20, p. 568-569, 1983.
- MOLINA, R.; LOHSE, J.M.; NIETO, J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet Ther.* 2, 261–267, 2001.
- MOLINA, R.; ESPINOSA-GONGÓRA, C., GÁLVEZ, R. et al. Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Parasitol*, v.187, n.3-4, p. 529-533, 2012.
- MOREIRA, F.D.; SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol*, v.122, 245 – 252, 2004.

- OLIVEIRA, T.M.F.S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesiacanis* and *Erlichianicis* in enzyme-linked immunoabsorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet*, n. 17, v.1, p.7-11, 2008.
- QUINNEL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol*, v.136, 1915-1934, 2009.
- REITHINGER, R.; COLEMAN, P.G.; ALEXANDER, B. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*, v.34, p.55-62, 2004.
- REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C.R. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*, n.5, 872 – 876, 2001.
- RIBEIRO, V.M.; SILVA, S. M.; MENZ, I. et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brazil. *Parasites and vectors*, v.6, n.8, 2013.
- RUTLEDGE, L.C.; GUPTA, R.K. Mothflies and Sandflies (Psychodidae). In: MULLEN, G. R.; DURDEN, L.A. *Medical and Veterinary Entomology*, São Diego: Elsevier, p.147 -161, 2002.
- SANT'ANNA, M.R.V.; JONES, N.G.; HINDLEY, J.A. et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*, v.107, 230-237, 2008.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne Diseases*, v.45, 255-272, 2008.
- SHERLOCK, I.A. Importância médico-veterinária. IN: RANGEL, E.F; LAINSON, R. (orgs). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.15 – 21, 2003.
- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, vol 165, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasite and Vectors*, v.4, n.86, 2011.
- TODD, G.D.; WOHLERS, D.; CITRA, M.J. Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. *US Department of Health and Human Services*, set., 2003. Disponível em [\[http://stacks.cdc.gov/view/cdc/6499/\]](http://stacks.cdc.gov/view/cdc/6499/). Acesso em 09 de dezembro de 2013.
- VERÇOSA, B.L.A.; LEMOS, C.C.; MENDONÇA, I.L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, v.4, n.45, 2008.
- VULPIANI, M.P.; IANETTI, L.; PAGANICO, D. et al. Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: state of art. *Veterinary Medicine International*, 2011.

WISNER, T.; MEANS, C. Toxicology of newer insecticides in small animals. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 42, n.2, p.335-347, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A human-right based approach to neglected tropical diseases, p. 1-4, 2009. Disponível em

<<http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/human-rights/en/index.html>> Acessado em: 16 de março de 2012.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, n. 54, 1994.

6 ANEXOS

Anexo 1 – Planilha para registro individual, por tempo, e para classificação dos flebótomos

MORTOS				
	Machos	Fêmeas alimentadas	Fêmeas não alimentadas	Subtotal Mortos
Cão 1				
Cão 2				
Cão 3				
Cão 4				
Cão 5				
Cão 6				
Cão 7				
Cão 8				
Cão 9				
Cão 10				
Cão 11				
Cão 12				
Total Mortos:				

•

VIVOS				
	Machos	Fêmeas alimentadas	Fêmeas não alimentadas	Subtotal Vivos
Cão 1				
Cão 2				
Cão 3				
Cão 4				
Cão 5				
Cão 6				
Cão 7				
Cão 8				
Cão 9				
Cão 10				
Cão 11				
Cão 12				
Total Vivos:				

Anexo 2 - Número de flebótomos utilizados para cálculo das porcentagens - Efeito inseticida - Grupo 1

T0	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	104	1	0,96
Cão 2	68	0	0
Cão 3	78	3	3,8
Cão 4	46	0	0
Cão 5	83	1	1,2
Cão 6	78	0	0

T7	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	85	2	2,3
Cão 2	54	6	11,1
Cão 3	68	20	29,4
Cão 4	44	3	6,8
Cão 5	45	9	20,0
Cão 6	52	20	38,4

T21	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	68	8	11,7
Cão 2	59	7	11,8
Cão 3	31	2	6,4
Cão 4	58	13	22,4
Cão 5	57	0	0
Cão 6	52	7	13,4

T60	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	33	0	0
Cão 2	87	4	4,5
Cão 3	81	8	9,8
Cão 4	60	3	5,0
Cão 5	78	1	1,28
Cão 6	55	0	0

T90	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	97	7	7,2
Cão 2	61	9	14,7
Cão 3	58	12	20,6
Cão 4	90	8	8,8
Cão 5	112	5	4,4
Cão 6	27	8	29,6

T120	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	69	10	14,4
Cão 2	106	17	16,0
Cão 3	117	16	13,6
Cão 4	145	8	5,5
Cão 5	79	12	15,1
Cão 6	151	7	4,6

¹- flebótomos machos e fêmeas no total ²- flebótomos machos e fêmeas mortos

Anexo 3 - Número de flebótomos utilizados para cálculo das porcentagens – Efeito inseticida – Grupo 2

T0	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	64	8	12,5
Cão 8	43	5	11,6
Cão 9	65	13	20,0
Cão 10	65	0	0
Cão 11	10	1	1,0
Cão 12	43	10	23,2

T7	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	45	15	27,2
Cão 8	64	14	21,8
Cão 9	62	13	20,9
Cão 10	21	1	4,7
Cão 11	63	8	12,6
Cão 12	53	5	9,4

T21	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	56	15	26,7
Cão 8	16	8	50,0
Cão 9	11	5	45,4
Cão 10	41	8	19,5
Cão 11	41	6	14,6
Cão 12	45	4	8,8

T60	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	53	11	20,7
Cão 8	34	10	29,4
Cão 9	51	16	31,3
Cão 10	42	5	11,9
Cão 11	92	18	19,5
Cão 12	41	4	9,7

T90	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	93	6	6,4
Cão 8	60	15	25,0
Cão 9	114	20	17,5
Cão 10	72	9	12,5
Cão 11	115	8	6,9
Cão 12	108	4	3,7

T120	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 7	100	8	8,0
Cão 8	100	4	4,0
Cão 9	102	2	1,9
Cão 10	42	6	14,2
Cão 11	135	15	11,1
Cão 12	144	9	6,2

¹- flebótomos machos e fêmeas no total ²- flebótomos machos e fêmeas mortos

Anexo 4 - Número de flebótomos utilizados para cálculo das porcentagens - Efeito repelência - Grupo 1

T0	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	75	37	49,3
Cão 2	36	31	86,1
Cão 3	48	32	66,6
Cão 4	32	21	65,6
Cão 5	43	34	79,0
Cão 6	42	41	97,6

T7	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	37	33	89,1
Cão 2	22	15	68,1
Cão 3	27	21	77,7
Cão 4	16	15	93,7
Cão 5	21	20	95,2
Cão 6	30	28	93,3

T21	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	46	38	82,6
Cão 2	42	38	90,4
Cão 3	18	17	94,4
Cão 4	42	38	90,4
Cão 5	42	36	85,7
Cão 6	30	26	86,6

T60	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	25	22	88,0
Cão 2	41	38	92,6
Cão 3	42	33	78,5
Cão 4	35	34	97,1
Cão 5	44	43	97,7
Cão 6	20	20	100

T90	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	46	32	69,5
Cão 2	37	25	67,5
Cão 3	37	34	91,8
Cão 4	27	22	81,4
Cão 5	59	43	72,8
Cão 6	18	18	100

T120	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 1	31	27	87,0
Cão 2	63	61	96,8
Cão 3	62	59	95,1
Cão 4	71	64	90,1
Cão 5	52	52	100
Cão 6	58	55	94,8

Anexo 5 - Número de flebótomos utilizados para cálculo das porcentagens - Efeito inseticida - Grupo 2

T0	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	41	39	95,1
Cão 8	21	18	85,7
Cão 9	29	28	96,5
Cão 10	35	28	80,0
Cão 11	5	4	80,0
Cão 12	25	25	100

T7	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	27	20	74,0
Cão 8	36	27	75,0
Cão 9	28	24	85,7
Cão 10	9	6	66,6
Cão 11	36	27	75,0
Cão 12	41	27	65,8

T21	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	31	20	64,5
Cão 8	9	9	100
Cão 9	9	8	88,8
Cão 10	24	17	70,8
Cão 11	21	17	80,9
Cão 12	31	19	61,2

T60	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	21	18	85,7
Cão 8	14	13	92,8
Cão 9	23	22	95,6
Cão 10	18	18	100
Cão 11	42	35	83,3
Cão 12	25	24	96,0

T90	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	63	56	88,8
Cão 8	37	34	91,8
Cão 9	79	71	89,8
Cão 10	35	34	97,1
Cão 11	66	53	80,3
Cão 12	79	56	70,8

T120	Total (fêmeas)	Fêmeas não-alimentadas	%
Cão 7	55	53	96,3
Cão 8	52	52	100
Cão 9	43	42	97,6
Cão 10	23	23	100
Cão 11	81	79	97,5
Cão 12	76	62	81,5

Anexo 7 – Valores de referência laboratoriais para a espécie canina.

Hemograma

Parâmetro (unidade)	Valor de referência
Hemácias (milhões/mm ³)	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g%)	12 – 18
Hematócrito (%)	37 – 55
VCM (fl)	60 – 77
CHCM (%)	31 – 36
Leucócitos totais (/mm ³)	6000 – 17000
Bastonetes (/mm ³)	0 – 300
Neutrófilos segmentados (/mm ³)	3000 – 11500
Linfócitos (/mm ³)	1000 - 4800
Monócitos (/mm ³)	150 – 1350
Eosinófilos (/mm ³)	100 – 1250
Plaquetas (/mm ³)	175.000 – 500.000

Parâmetros Bioquímicos

Parâmetro (unidade)	Valor de referência
Ureia (mg/dL)	20 – 56
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5
ALT (U/L)	0 – 110
AST (U/L)	0 – 100
FA (U/L)	20 - 156
Proteínas totais (g/dL)	5,4 – 7,5
Albuminas (g/dL)	2,3 – 3,1
Globulinas (g/dL)	2,7 – 4,4

Anexo 7 - Médias obtidas por grupo a cada tempo de exposição, em porcentagem.

Efeito inseticida

	T0	T7	T21	T60	T90	T120
Grupo 1	1,0%	17,2%	11,3%	4,0%	11,0%	10,4%
Grupo 2	12,7%	18,1%	21,9%	20,4%	11,0%	7,0%

Efeito repelência

	T0	T7	T21	T60	T90	T120
Grupo 1	71%	86,2%	87,7%	91,7%	77,6%	94,3%
Grupo 2	91%	74%	72%	90,9%	84,6%	94,2%

Anexo 9 - Número de flebótomos utilizados para cálculo das porcentagens - Efeito inseticida

T0	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	50	4	8
Cão 2	45	5	11,1
Cão 3	58	4	6,8
Cão 4	64	4	6,2
Cão 5	64	3	4,8
Cão 6	50	3	6
Cão 7	65	2	3
Cão 8	54	4	7,4

T30	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	71	3	4,5
Cão 2	60	5	8,3
Cão 3	64	15	23,4
Cão 4	87	8	9,1
Cão 5	69	10	14,4
Cão 6	94	40	42,5
Cão 7	66	6	9
Cão 8	73	4	5,4

T60	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	141	26	18,4
Cão 2	114	17	14,9
Cão 3	66	24	36,3
Cão 4	112	22	19,6
Cão 5	40	10	25
Cão 6	69	16	23,1
Cão 7	36	11	30,5
Cão 8	67	11	16,4

T90	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	56	15	26,7
Cão 2	145	50	34,4
Cão 3	4663	13	28,2
Cão 4	67	10	14,9
Cão 5	63	20	31,7
Cão 6	111	29	26,1
Cão 7	88	17	19,3
Cão 8	82	13	15,8

T111	Total ¹	Mortos ²	%
Cão 1	107	27	25,2
Cão 2	127	23	18,1
Cão 3	82	43	52,4
Cão 4	110	63	57,2
Cão 5	51	16	31,3
Cão 6	48	20	41,6
Cão 7	52	13	25
Cão 8	50	24	48

1 –Flebótomos machos e fêmeas / 2 – Flebótomos mortos, machos e fêmeas, alimentadas ou não

Anexo 10 - Número de flebotomos utilizados para cálculo das porcentagens - Efeito repelência

T0	Total ¹	Não alimentadas ²	%
Cão 1	35	28	80
Cão 2	30	5	16,6
Cão 3	32	19	59,3
Cão 4	42	30	71,4
Cão 5	49	45	91,8
Cão 6	37	33	89,1
Cão 7	53	36	67,9
Cão 8	41	37	90,2

T30	Total ¹	Não alimentadas ²	%
Cão 1	45	41	91,1
Cão 2	40	36	90
Cão 3	34	22	64,7
Cão 4	45	37	82,2
Cão 5	36	27	75
Cão 6	40	14	35
Cão 7	31	28	90,3
Cão 8	33	31	93,9

T60	Total ¹	Não alimentadas ²	%
Cão 1	89	66	74,1
Cão 2	69	61	88,4
Cão 3	35	19	54,2
Cão 4	69	57	82,6
Cão 5	26	20	76,9
Cão 6	39	26	66,6
Cão 7	19	14	73,6
Cão 8	41	33	80,4

T90	Total ¹	Não alimentadas ²	%
Cão 1	35	23	65,7
Cão 2	66	45	68,1
Cão 3	27	18	66,6
Cão 4	25	20	80
Cão 5	31	17	54,8
Cão 6	60	37	61,6
Cão 7	53	39	73,5
Cão 8	51	45	88,2

T111	Total ¹	Não alimentadas ²	%
Cão 1	60	43	71,6
Cão 2	72	56	77,7
Cão 3	32	15	46,8
Cão 4	51	17	33,3
Cão 5	24	17	70,8
Cão 6	37	16	43,2
Cão 7	35	18	51,4
Cão 8	26	15	57,6

1 – Flebótomos fêmeas / 2 – fêmeas não alimentadas

Anexo 11 – Médias em porcentagem (%), por tempo, relativas aos efeitos repelência e inseticida

	T0	T30	T60	T90	T111
Repelência	29,1	29,5	37	30,5	24,6
Inseticida	3,6	11,3	17,1	20,8	28,6