

Mise en évidence
de la transmission transovarienne
du virus Pacui
chez *Lutzomyia flaviscutellata*
(Phlebotominae).
Conséquences épidémiologiques ⁽¹⁾

Jean-Pierre HERVÉ ⁽²⁾,
Amélia P. A. TRAVASSOS DA ROSA ⁽³⁾,
Gregorio C. SÁ FILHO ⁽⁴⁾,
Jorge F. TRAVASSOS DA ROSA ⁽³⁾,
Francisco P. PINHEIRO ⁽⁵⁾

Résumé

*La transmission verticale du virus Pacui, chez le phlébotome *Lutzomyia flaviscutellata*, a été mise en évidence au cours d'une expérience conduite de décembre 1981 à janvier 1982, dans une forêt des environs de Belém, Pará (Brésil).*

La valeur relativement élevée du taux de transmission transovarienne, estimé à plus de 10 %, laisse à penser que ce type de transmission joue un rôle non négligeable dans le cycle selvatique de cette arbovirose. En fait, la transmission verticale est très probablement un phénomène indispensable à la survie du virus Pacui, contraint de se maintenir sur place à cause des faibles capacités de dispersion à la fois de son vecteur et de ses hôtes vertébrés.

Mots-clés : Transmission transovarienne — Arbovirus — Virus Pacui — *Lutzomyia flaviscutellata* — Phlébotome — Brésil.

Summary

DEMONSTRATION OF THE TRANSOVARIAN TRANSMISSION OF PACUI VIRUS IN *Lutzomyia flaviscutellata* (PHLEBOTOMINAE). EPIDEMIOLOGICAL IMPLICATIONS. *The vertical transmission of Pacui virus has been demonstrated in the sandfly *Lutzomyia flaviscutellata*. Experiments were done between december, 1981 and january, 1982 in a forest near the town of Belém, Pará (Brazil).*

The rather high value of the transovarian transmission rate (estimated to be about 10 %) allows us to think that this type of transmission plays an important part in the selvatic cycle of this arbovirus. Thus, Pacui virus,

(1) Travail ayant bénéficié d'une subvention du CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

(2) Entomologiste médical de l'O.R.S.T.O.M., Instituto Evandro Chagas, F. SESP, C.P. 621, 66 000 Belém, Pará, Brésil.

(3) Virologues à l'I.E.C., même adresse.

(4) Entomologiste médical à l'I.E.C., même adresse.

(5) Ex-Directeur de l'I.E.C., F. SESP, Consultant OMS en viroses, Unité d'Épidémiologie, P.A.H.O., O.M.S., Washington, U.S.A.

with a vector and vertebrate hosts unable of much dispersion, may be obliged to use this type of transmission in order to survive at the same place.

Key words : Transovarian transmission — Arbovirus — Pacui virus — *Lutzomyia flaviscutellata* — Sandfly — Brazil.

1. Introduction

Le virus Pacui, arbovirus du groupe Phlebotomus, a été isolé, au Brésil, de rongeurs forestiers (Woodall, 1967 ; Taylor, 1967) et de phlébotomes appartenant à l'espèce *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942) (Aitken *et al.*, 1975).

Sur cent souches isolées de ces phlébotomes, trois provenaient de lots constitués exclusivement de mâles. La transmission transovarienne avait alors été envisagée comme une des explications possibles de ces isollements.

Une expérience réalisée à l'Institut Evandro Chagas (Fondation S.E.S.P.) en décembre 1981 et janvier 1982 permet, en recourant à des femelles naturellement infectées, de démontrer le passage transovarien du virus Pacui chez *L. flaviscutellata*.

2. Matériel et méthodes

2.1. PRINCIPE EXPÉRIMENTAL

Des femelles de *L. flaviscutellata* ont été capturées en forêt et mises à pondre au laboratoire. Les femelles d'une part et leurs pontes d'autre part ont ensuite fait l'objet de tentatives d'isolement d'arbovirus.

2.2. ZONE D'ÉTUDE

Notre choix s'est porté sur la localité même où Aitken *et al.* (*op. cit.*) ont obtenu leur série d'isollements. Les captures ont donc eu lieu dans un îlot forestier, dit « forêt de Gatu » (1°28' S-47°55' W), lequel est situé dans l'enceinte de l'I.P.E.A.N. (Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuarias do Norte) et appartient à la nappe forestière amazonienne enserrant au nord et à l'est la ville de Belém. Cette forêt, non inondable, est du type humide sempervirent (Rizzini, 1979). Le climat est du type équatorial.

2.3. MÉTHODES D'ÉTUDE

Toutes les techniques que nous avons utilisées pour la capture et l'élevage de *L. flaviscutellata* ont

été mises au point et décrites en détails par Ward (1977). Nous n'en ferons donc qu'un bref rappel.

2.3.1. Capture et gorgement des femelles

Les femelles sont capturées au moyen d'un piège utilisant comme appât un rongeur de l'espèce *Proechimys guyanensis* (Geoffroy, 1803). Le piège est visité quotidiennement et seules les femelles complètement gorgées de sang, en principe sur l'appât, sont récoltées et ramenées au laboratoire.

2.3.2. Obtention des pontes

Les femelles gorgées sont conservées à l'insectarium, dans des tubes de plastique individuels, et dans une atmosphère dont le degré hygrométrique est toujours supérieur à 95 %. Elles pondent, environ trois jours après leur gorgement, sur le papier filtre humide disposé à l'intérieur du tube.

2.3.3. Méthode d'isolement

Les femelles d'une part, les œufs d'autre part, sont regroupés en lots de telle sorte qu'à chaque lot de femelles corresponde un lot regroupant les œufs pondus par celles-ci.

Ces lots font l'objet de tentatives d'isolement d'arbovirus par inoculation directe aux souriceaux nouveau-nés. Les tentatives de réisolement et les épreuves de titrage sont réalisées par ensemencement sur cellules Véro.

3. Résultats

3.1. ISOLEMENTS ET IDENTIFICATION

Du 11 décembre 1981 au 29 janvier 1982, 403 femelles de *L. flaviscutellata* ont été capturées gorgées. Elles ont pondu 13 865 œufs.

Ces femelles ont été regroupées en 35 lots contenant de 3 à 24 individus. Les 35 lots de ponte correspondant contenaient de 163 à 569 œufs.

Une souche (BE AR 400 231), identifiée au virus Pacui, a été isolée de 14 femelles récoltées le 29 janvier 1982.

Une souche (BE AR 400 232), identifiée au

même virus, a été isolée à partir des 532 œufs pondus le 2 février par ces mêmes femelles.

L'identification des souches a été faite au moyen du test de fixation du complément (Fulton et Dumbell, 1946), en utilisant un sérum préparé à partir de la souche prototype BE AN 27 326.

3.2. CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES ISOLÉES

Le temps d'incubation chez les souriceaux nouveau-nés à partir du broyat initial est de 10 à 11 jours (valeur moyenne 10,7) pour la souche obtenue des femelles et de 15 jours pour celle obtenue de leurs œufs. Dès le premier passage, le temps d'incubation s'est réduit à quatre jours pour la souche BE AR 400 231 (ce qui correspond au temps d'incubation d'une souche du virus Pacui adaptée aux souriceaux), alors qu'il a fallu attendre le deuxième passage pour obtenir la même valeur avec la souche BE AR 400 232.

La souche provenant des femelles a été réisolée sur culture de tissu (titrage au réisolement : $\log TCD_{50} = 2,25$), alors que toutes les tentatives de réisolement sur culture cellulaire à partir du broyat initial d'œufs se sont avérées infructueuses.

Il semble, d'après ces observations, que le titre du virus soit plus faible dans les œufs que chez les femelles dont ils sont issus. La transmission transovarienne s'accompagnerait donc d'une notable déperdition virale.

Cependant, en reprenant les données disponibles à l'I.E.C. et relatives aux isolements d'Aitken *et al.* (*op. cit.*) de 1968 à 1970, on constate que les souches isolées de mâles, comme celles isolées de femelles, présentent à partir du broyat initial un temps d'incubation chez le souriceau toujours inférieur à 13 jours et que le temps d'incubation de ces souches se stabilise généralement à quatre jours dès le premier passage. Ainsi, le titre à l'isolement des souches obtenues de mâles (donc d'origine transovarienne) apparaît-il, comme celui des souches obtenues de femelles, supérieur à celui des souches isolées à partir d'œufs. Cela signifie qu'après la baisse du titre viral consécutive au passage transovarien du virus, on assiste à une restauration de ce titre chez les adultes issus de ces œufs. Il y a donc eu multiplication du virus, soit pendant le développement préimaginal, soit chez l'adulte.

Ce phénomène a déjà été mis en évidence chez *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild et Hertig, 1952) par Tesh *et al.* (1972), au cours d'une expérience de transmission transovarienne du virus de la stomatite vésiculaire — sérotype Indiana (VS1). Ces

auteurs ont en effet constaté, après passage transovarien de ce virus, que son titre était minimum dans les œufs puis augmentait régulièrement à chacun des stades préimaginaux, jusqu'à atteindre, chez les adultes, sa valeur maximum.

3.3. RÉALITÉ DES ISOLEMENTS

Aucune souche du virus Pacui n'a été isolée depuis plus d'un an à Belém. Ce virus n'a, en outre, fait l'objet d'aucune expérience de laboratoire. Ceci écarte donc, de façon formelle, toute possibilité de contamination à partir d'un matériel autre que celui étudié.

La souche BE AR 400 231 a été réisolée (*cf.* paragraphe 3.2.), ce qui confirme la réalité de son isolement.

La souche BE AR 400 232 n'a pu être réisolée sur culture de tissu et le réisolement sur souriceau nouveau-né n'a pas été tenté. Cependant toute contamination à partir de la souche précédente est totalement exclue car, ni à l'isolement ni au cours des différents passages, il n'y a eu manipulation simultanée du matériel.

3.4. TAUX D'INFECTION

Le taux minimum d'infection, par le virus Pacui, des femelles mises en lot lors de notre expérience est égal à 2,5 ‰ (une souche isolée à partir de 403 femelles récoltées). Ce taux ne diffère pas significativement de celui de 2,1 ‰, constaté par Aitken *et al.* dans la même localité (Écart-réduit : $\varepsilon = 1,861$). Ces auteurs avaient alors isolé 96 souches de ce même virus à partir de 45 630 femelles récoltées d'octobre 1968 à septembre 1970.

Rappelons que trois souches du virus Pacui avaient alors également été isolées à partir de 13 962 mâles de *L. flaviscutellata* récoltés pendant la même période et dans la même localité. Le taux d'infection des mâles s'évaluait donc à 0,215 ‰.

3.5. TAUX DE TRANSMISSION TRANSOVARIENNE

La probabilité pour que plus d'une femelle ait été infectée parmi les 14 constituant le lot ayant permis notre isolement du virus Pacui, est très faible, de l'ordre de 0,04. Cela signifie que la souche isolée des œufs provient d'une seule des 14 pontes formant le lot. Or ces pontes contenaient entre 25 et 56 œufs. Le taux minimum de transmission transovarienne a donc une valeur comprise entre 4 ‰ (1/25) et 1,9 ‰ (1/56). Cependant le virus était

probablement présent dans plusieurs des œufs de la ponte à partir de laquelle il a été isolé.

Cette hypothèse semble se confirmer si l'on se livre au calcul du taux de transmission sur la base des données fournies par la publication d'Aitken *et al.* (*op. cit.*). En effet, en admettant que les isollements obtenus de mâles par ces auteurs soient tous les trois le fait de la transmission transovarienne (hypothèse d'autant plus vraisemblable que ce type de transmission vient d'être démontré expérimentalement), on peut considérer que le taux d'infection des mâles est égal au produit du taux d'infection des femelles par le taux de transmission transovarienne. Le taux de transmission transovarienne est alors égal à 10,2 %, valeur très nettement supérieure aux taux minimaux que nous avons précédemment calculés sur la base de notre propre expérience. À noter que la valeur de ce taux, ici calculé *in natura*, bien que très élevée, n'atteint pas celles, comprises entre 20 et 25 %, qu'ont obtenues expérimentalement Tesh *et al.* (*op. cit.*) lors de la transmission transovarienne du virus VSI chez *L. trapidoi*.

4. Discussion et conclusion

La démonstration de la transmission transovarienne du virus Pacui chez *L. flaviscutellata* au moyen de femelles naturellement infectées, associée au fait que trois souches de ce virus avaient déjà été isolées de mâles de ce phlébotome, confirme la réalité de cette transmission dans la nature.

En fait, il semble que la transmission transovarienne d'arbovirus (et plus particulièrement ceux appartenant au genre *Phlebovirus*) soit relativement fréquente chez les phlébotomes. Whittingham (1924), puis Moshkovky *et al.* (1937) et Petrisceva et Alymov (1939) l'avaient déjà mise en évidence chez *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786), pour un virus de la fièvre à pappataci (SF) qui n'avait pu alors être typé. Tesh *et al.* (*op. cit.*) ont pour leur part démontré expérimentalement le passage transovarien du virus VS-Indiana (VSI) chez *L. trapidoi* et *Lutzomyia ylephiletor* (Fairchild et Hertig, 1952). Tesh (com. pers.) a récemment obtenu, chez *Lutzomyia longipalpis* (Lutz et Neiva, 1912), des résultats identiques avec le virus BE AR 411 391, arbovirus nouveau du genre *Vesiculovirus* isolé au Brésil.

Autre fait s'inscrivant en faveur de cette transmission est la fréquence relativement élevée d'isollements d'arbovirus (généralement de *Phlebovirus*)

obtenus de mâles de phlébotomes. Ont ainsi été isolées de mâles de ces insectes :

- Les trois souches de virus Pacui déjà mentionnées (Aitken *et al.*, *op. cit.*).
- Six souches d'un virus de la fièvre à pappataci (SF), type non précisé (Barnet et Suyemoto, 1961).
- Trois souches du virus de la fièvre à pappataci, type Sicilian (SFS), (Schmidt *et al.*, 1971 ; Tesh *et al.*, 1977).
- Une souche du virus Karimabad (Tesh *et al.*, 1977).
- Une souche du virus Chagres, sept du virus Aguacate, deux du virus Cacao, une du virus Changuinola, une du virus Chilibre et quatre du virus Punta-Toro-CO AR 3 319 (Tesh *et al.*, 1974 ; Tesh *et al.*, 1975).
- Une souche du virus BE AR 407 981, probablement nouveau (non publié), une du virus BE AR 411 391, nouveau également (Travassos da Rosa, en préparation) et une du virus BE AR 413 570, également nouveau (non publié), toutes trois isolées à l'Institut Evandro Chagas.

Le taux de transmission transovarienne, relativement élevé (plus de 10 %), constaté chez *L. flaviscutellata*, vis-à-vis du virus Pacui, montre que ce type de transmission joue un rôle considérable dans le maintien en circulation de ce virus. Le calcul montre que ce taux reste trop faible pour permettre au virus de se maintenir chez le phlébotome, par ce seul biais, au delà de la troisième ou quatrième génération. D'autre part, si le maintien du virus était assuré par ce seul type de transmission, les valeurs respectives des taux d'infestation des mâles et des femelles devraient être sensiblement égales. Or le taux d'infestation, tel qu'il a été observé par Aitken *et al.* (*op. cit.*) chez les femelles, est environ dix fois supérieur à celui des mâles.

Ainsi sommes-nous conduits à admettre que, dans le cas du virus Pacui, un phénomène autre que la transmission transovarienne est nécessaire à la survie de ce virus. Cette conclusion est analogue à celle de Tesh *et al.* (1972) pour le virus VSI et pour une valeur du taux de transmission de l'ordre de 20 à 30 %. Nous avons calculé que, sur les 96 souches isolées de femelles par Aitken *et al.* (*op. cit.*), dix seulement étaient susceptibles d'avoir une origine transovarienne. Or le virus Pacui a été isolé à diverses reprises de rongeurs des genres *Oryzomys* et *Zygodontomys* (Woodall, 1967 ; Jonkers *et al.*,

1968 ; Taylor, *op. cit.*). En outre les enquêtes sérologiques conduites par Aitken *et al.* (*op. cit.*), toujours dans la même aire de recherche, ont montré une prévalence d'anticorps dirigés contre ce virus chez 20 à 40 % des marsupiaux et rongeurs forestiers terrestres. Il est donc logique de penser que les populations de femelles de phlébotomes se rechargent en virus sur ces mammifères qui jouent vraisemblablement le rôle d'amplificateurs, dont l'importance relative a été définie dans les cycles de transmission horizontaux d'arbovirus, où les hôtes vertébrés ne semblent pas, en général, assumer la fonction de « réservoirs » (Germain *et al.*, 1978).

La transmission transovarienne reste cependant indispensable à la survie du virus. En effet, en raison des faibles capacités de dispersion de *L. flaviscutellata* (de l'ordre de quelques mètres, avec un maximum qui ne devrait pas atteindre 200, P. Ready, *com. pers.*) et de ses hôtes vertébrés (entre 30 et 150 m pour les rongeurs des genres *Oryzomys* et *Proechimys* (Aitken *et al.*, *op. cit.*), une population donnée de femelles de ce phlébotome ne se trouve en contact trophique qu'avec un nombre d'hôtes vertébrés très limité. Il en résulte que, lors d'une épizootie à virus Pacui, les populations de mammifères réceptifs acquièrent rapidement une immunité qui rend impossible toute transmission du virus du phlébotome à l'hôte vertébré. En conséquence, la survie du virus n'est plus assurée que par son maintien sur place grâce à la transmission transovarienne. Cela signifie que toute résurgence épizootique du virus est fonction de l'apparition des jeunes dans les populations de mammifères hôte. Des expériences d'inoculation de ce virus à des rongeurs du genre *Oryzomys* (Aitken *et al.*, *op. cit.*) ont montré que seuls les jeunes, inoculés avec une dose très faible de virus, faisaient une virémie. Ce résultat laisse à penser, hypothèse d'ailleurs déjà envi-

sagée par ces auteurs et par Woodall (1982), que l'infection des rongeurs se fait uniquement chez les jeunes au nid.

Nous sommes donc en présence, avec le virus Pacui, d'un arbovirus pour lequel le passage sur l'hôte vertébré amplificateur demeure encore indispensable, mais semble cependant, grâce à l'adaptation que constitue la transmission transovarienne, pouvoir se réduire à son strict minimum.

Cette adaptation du virus à l'arthropode peut être encore plus grande. C'est ainsi que certains arbovirus ont été isolés de mâles de phlébotomes avec une fréquence égale ou supérieure à celle des isolements réalisés à partir des femelles des mêmes espèces (résultats non publiés ; Tesh *et al.*, 1974). Dans de tels cas, une très forte présomption s'exprime en faveur de taux de transmission transovarienne égaux ou voisins de 100 %. Il est alors possible d'envisager la suppression du « maillon » hôte vertébré dans le cycle de ces arbovirus, dont le maintien pourrait être assuré par les seuls phlébotomes. Dans ce cas, la transmission à des hôtes vertébrés semblerait ne plus revêtir qu'un caractère sporadique et subsidiaire, en n'intervenant plus, ou très peu, dans le cycle de maintien et de multiplication du virus, tandis que l'arthropode constituerait le « vecteur-réservoir » parfait (Germain *et al.*, *op. cit.*).

REMERCIEMENTS

Les auteurs sont redevables au Directeur de l'IPEAN, qu'ils tiennent plus particulièrement à remercier ici, d'avoir pu réaliser leur recherche dans l'enceinte de cet Institut.

Ils remercient également le personnel de la section des virus de l'I.E.C. qui a participé aux séances de capture et aux travaux en laboratoire.

Enfin ils expriment toute leur reconnaissance aux Docteurs M. Germain, J. Mouchet et N. Dégallier pour leurs conseils et les corrections qu'ils ont apportées au manuscrit

BIBLIOGRAPHIE

- AITKEN (T. H. G.), WOODALL (J. P.), ANDRADE (A. H. P. de), BENSABATH (G.) et SHOPE (R. E.), 1975. — Pacui virus, Phlebotomine flies and small mammals in Brazil : an epidemiological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 2 : 358-368.
- BARNET (H. C.) et SUYEMOTO (W.), 1961. — Field studies on sandfly fever and kala-azar in Pakistan, in Iran and in Balistan (Little Tibet) Kashmir. *Trans. N. Y. Acad. Science, Ser. II*, 23 : 609-617.
- FULTON (F.) et PUMBELL (K. R.), 1946. — The serological

comparison of strains of influenza virus. *J. Gen. Microbiol.*, 3 : 97.

- GERMAIN (M.), MOUCHET (J.), CORDELLIER (R.), CHIPPAUX (A.), CORNET (M.), HERVÉ (J. P.), SUREAU (P.), FABRE (J.) et ROBIN (Y.), 1978. — Épidémiologie de la fièvre jaune en Afrique. *Méd. Mal. Infectieuses*, 2, 8 : 69-77.
- JONKERS (A. H.), SPENCE (L.), DOWNS (W. G.), AITKEN (T. H. G.) et TIKASINGH (E. S.), 1968. — Arbovirus studies in Bush-Bush forest, Trinidad, W. I., september

- 1959-december 1964. V. Virus isolations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17, 2 : 276-284.
- MOSEKOVSKY (S. D.), DEMINA (N. A.), NOSINA (V. D.), PAVLOVA (E. A.), LIVSIC (I. M.), PELS (G. Y.) et RUBTZOVA (V. P.), 1937. — « Transmission du virus de la fièvre à pappataci au moyen de *Phlébotomus* obtenus d'œufs pondus par des femelles infectées ». *Med. Parazitol. e Parazitarn. Bol. (Moscou)*, 6 : 922-927.
- PETRISCEVA (P. A.) et ALYMOV (A. Ja), 1939. — « A propos de la transmission transovarienne du virus de la fièvre à pappataci par les phlébotomes ». *Arch. Biolog. Nauk.*, 51, 1 : 138-144.
- RIZZINI (C. T.), 1979. — Tratado de fitogeographia do Brasil, vol. II, Ed. Hucited, EDUSP, 374 p.
- SCHMIDT (J. R.), SCHMIDT (M. L.) et SAID (M. I.), 1971. — Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of phlebotomus fever virus from *Phlebotomus papatasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20, 3 : 483-490.
- TAYLOR (R. M.), 1967. — Catalogue of arthropod-borne viruses of the world. Public Health Service Publication N° 1760, U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- TESH (R. B.), CHANIOTIS (B. N.) et JOHNSON (K. M.), 1972. — Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) : transovarial transmission by phlebotominae sandflies. *Science*, 175 : 1477-1479.
- TESH (R. B.), CHANIOTIS (B. N.), PERALTA (P. M.) et JOHNSON (K. M.), 1974. — Ecology of virus isolated from panamanian phlebotominae sandflies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 2 : 258-269.
- TESH (R. B.), PERALTA (P. M.), SHOPE (R. E.), CHANIOTIS (B. N.) et JOHNSON (K. M.), 1975. — Antigenic relationships among phlebotomus fever group arbovirus and their implications for the epidemiology of sandfly fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 1 : 135-144.
- TESH (R. B.), SAIDI (S.), JAVADIAN (E.) et NADIM (A.), 1977. — Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 2 : 282-287.
- WARD (R. D.), 1977. — The colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera : Psychodidae), a vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *J. Med. Entomol.*, 14, 4 : 469-476.
- WHITTINGHAM (H. E.), 1924. — The ethiology of phlebotomus fever. *J. State Med.*, 32 : 461-469.
- WOODALL (J. P.), 1967. — Virus research in Amazonia. *Atas Simp. Biota Amazônica*, 6 : 31-63.
- WOODALL (J. P.), 1982. — The role of small mammals in arbovirus cycles : the Belém virus laboratory mammal recapture program. In : Internacional simposium on tropical arboviruses and haemorrhagic fevers, Belém, Para. Brazil 14-18 avril 1980. Academia Brasileira de Ciências Rio de Janeiro-RJ, Ed. Dr Francisco de Paula Pinheiro : 363-374.