

JOÃO AUGUSTO FRANCO LEONEL

**Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo**

São Paulo

2019

JOÃO AUGUSTO FRANCO LEONEL

**Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo:



Orientador

São Paulo

2019

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3873  
FMVZ

Leonel, João Augusto Franco  
Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em  
área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo / João Augusto  
Franco Leonel. – 2019.  
145 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde  
Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.  
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.  
Orientador: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. Citocromo B. 2. *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi*. 3. Extração de DNA. 4.  
*Leishmania* spp. kDNA. 5. Repasto sanguíneo. I. Título.



São Paulo, 21 de maio de 2018  
CEUax N [3005290817](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Dra. Trícia Maria Ferreira De Sousa Oliveira

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Equipe envolvida: João Augusto Franco Leonel - **executor** (faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia - Campus Pirassununga);

Dra. Trícia Maria Ferreira De Sousa Oliveira (orientador)

Título do projeto: "Hospedeiros de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica para leishmaniose visceral".

#### **Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 13/12/2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



São Paulo, 15 de outubro de 2019

CEUAX N 3005290817

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Dra. Trícia Maria Ferreira De Sousa Oliveira

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Dra. Trícia Maria Ferreira De Sousa Oliveira (orientador)

Título do projeto: "Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ** (ID 000829)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU** e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 07/outubro/2019) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos a alteração do título do projeto, pois os objetivos do mesmo foram ampliados ao longo do desenvolvimento do trabalho. Antes, focando em apenas uma espécie flebotomíneo (*L. longipalpis*), agora abrangendo mais espécies. "

Comentários da CEUA: "Alteração de título aprovada."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Autor:** LEONEL, João Augusto Franco

**Título:** Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a minha amada mãe, Vanda Lúcia Franco de Sá, a quem devo toda  
minha formação quanto pessoa e profissional.  
Te amarei para todo sempre.*

*Ao meu amado irmão, Luiz Henrique Franco Leonel, a memória da minha infância, a  
quem posso sempre contar.  
Te amo.*

*A minha amada avó, Nelsa Oliveira da Silveira, a força da felicidade e vontade de viver.  
Te amo.*

*Ao meu amado avô, Francisco Franco da Silveira (in memoriam), a dedicação ao trabalho.  
Te amo.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e sabedoria de todos os meus dias.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e a coordenação do programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), pela inigualável oportunidade de capacitação profissional.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo, (FZEA/USP) e ao Departamento de Medicina Veterinária (ZMV), por todo o apoio institucional para a realização das atividades deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado (Processo N° 2017/23436-0), que foi fundamental para a realização desse projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado (três meses), que ajudou no meu custeio inicial, posteriormente, cancelada após o aceite de bolsa da FAPESP.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, a quem tenho a felicidade de chamar de minha querida orientadora e amiga, primeiramente pela oportunidade e confiança para execução desse trabalho, segundo por toda orientação e conhecimento a mim transmitido desde as aulas da graduação. Para mim, será sempre um grande exemplo de médica veterinária, docente e pesquisadora.

Ao Dr. Fredy Galvis-Ovallos, pelo enorme carinho e disponibilidade em todas as nossas conversas, esclarecendo dúvidas e dando sugestões para o enriquecimento desse trabalho. Para mim, novamente, um exemplo de pesquisador.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, pela enorme doçura e disponibilidade em ensinar sobre a bioecologia, taxonomia e identificação de flebotomíneos das Américas, fundamental para a realização desse trabalho. Além disso, por abrir as portas do seu laboratório e acervo para estudo e esclarecimento de dúvidas. Um exemplo de docente e pesquisadora, para mim.



À Prof.<sup>a</sup> Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, pela gentileza de abrir as portas do Laboratório de Imunoparasitologia (LIPAIS), da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (FEIS/UNESP), de sua coordenação, para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Fábio dos Santos Nogueira, pela gentileza de abrir as portas do Laboratório Didático de Parasitologia, da Fundação Educacional de Andradina (FEA), de sua coordenação, para o desenvolvimento desse projeto.

À querida “irmã” Julia Cristina Benassi, por toda ajuda na rotina do laboratório, ensinamentos, broncas, sugestões e acima de tudo pela sua amizade verdadeira que me completa como pessoa e profissional.

Às minhas queridas “irmãs”, Ana Gabriela Gregório, Bruna Tannihão, Renata Meireles Coradine, Roberta Aline Waldrop e Tatiane Evangelista da Silva, pela amizade de tantos anos, pelo carinho, amor e paciência.

Aos meus queridos amigos Geovanna Vioti e Nuno Wolfgang Pereira pela amizade, parceria nas atividades do laboratório e na redação de artigos científicos.

Aos meus queridos amigos Diogo Tiago da Silva, Julio César Pereira Spada e Maria Luana Alves, pela amizade e grande ajuda na captura de flebotomíneos na cidade de Andradina e Ilha Solteira, São Paulo.

Aos meus queridos amigos Alex Kazuo Yamaguchi, Ana Flávia Rocha, Pedro Armando Meneghesso que tanto me ajudaram na rotina laboratorial do projeto.

Às minhas queridas, Marcia Bicudo de Paula, Mariana Dantas da Silva e Vanessa Gusmon da Silva, por todo o apoio sobremaneira na confecção e leitura das lâminas de identificação de flebotomíneos.

Aos secretários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Danival Lopes Moreira e Vanessa Alves Bispo, sempre muito gentis, atenciosos e prestativos no atendimento à solicitações e esclarecimentos de dúvidas.

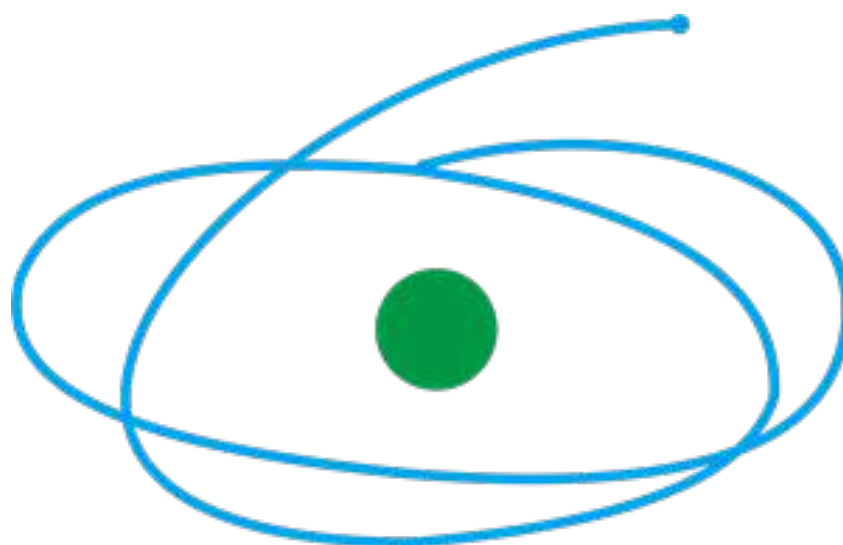
À Camila Molgara Gamba, chefe técnica da Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas quanto as normas de apresentação dessa dissertação.

Por fim, agradeço profundamente a todos que, direta ou indiretamente, estiveram ao lado desse jovem pesquisador que almeja a cada dia fazer ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo N° 2017/23436 – 0



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001



C A P E S

*“A paisagem redesenha a doença, assim como a doença é redesenhada pela paisagem.”*

*Profº Dr. Oswaldo Paulo Forattini*

## RESUMO

LEONEL, J. A. F. Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Atualmente, temos observado importantes mudanças nos padrões de transmissão da leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV) em áreas endêmicas do Brasil. Além disso, a LV vem avançando rapidamente para novas áreas antes consideradas indenes. Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são pequenos dípteros com grande relevância em ciências médicas e veterinárias, por serem vetores de vírus, *Bartonella bacilliformis* e principalmente *Leishmania* spp. Os estudos sobre esses insetos são fundamentais para uma melhor compreensão da complexa epidemiologia das leishmanioses, revelando os aspectos biológicos desses vetores e suas relações com o parasita e seus reservatórios. Atualmente, abordagens moleculares vêm sendo incluídas nesses estudos e mostram-se ser ferramentas poderosas em pesquisas sobre esses dípteros. O objetivo desse trabalho, foi investigar os aspectos bioecológicos de flebotomíneos em área endêmica de LT e LV no estado de São Paulo, Brasil. Assim, foi realizado um levantamento entomológico para descrever a fauna, sazonalidade, taxa de PCR positivo para o DNA de *Leishmania* spp. e as fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos na área de estudo. Os insetos foram triados, identificados e o tórax e abdômen das fêmeas amostradas submetidas a extração de DNA e posterior PCR para a detecção do DNA do Kinetoplasto (kDNA) de parasitas do gênero *Leishmania*. Em seguida, amostras de DNA de fêmeas ingurgitadas, semi-ingurgitadas e grávidas foram submetidas a PCR para a amplificação do gene mitocondrial citocromo B (CYT-B) de vertebrados. Os produtos amplificados nas reações de CYT-B foram purificados e submetidos ao sequenciamento genético. As sequências encontradas foram confrontadas com a base de dados GenBank, para identificação da espécie de vertebrado envolvido no repasto sanguíneo, das fêmeas de flebotomíneos. Por empregar ferramentas moleculares, nesse trabalho, também foi analisado o desempenho de alguns métodos de extração de DNA em amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas desses insetos. Em nosso estudo, foram encontradas doze espécies de flebotomíneos, entre vetores comprovados e suspeitos nos ciclos epidemiológicos de LT e LV. Não foram observados padrões sazonais entre os fatores climáticos estudados (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) e a fauna desses insetos, capturados com armadilhas luminosas do tipo CDC. Sobre os métodos de extração de DNA, os métodos comerciais são uma boa opção para esse tipo de amostra.

Contudo, os métodos caseiros baseado em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ou em NaCl/álcool apresentaram melhores resultados. As análises moleculares revelaram uma fêmea não ingurgitada de *Ev. (Ald.) carmelinoi* positiva na PCR do kDNA de *Leishmania* spp. A identificação das fontes de repasto sanguíneo revelou os suínos, humanos, cães, bovinos, galinhas e gambás como hospedeiros vertebrados de flebotomíneos na área em estudo. As implicações desses achados são aqui apresentadas na forma de dois artigos científicos submetidos para avaliação em revistas da área.

**Palavras-chave:** Citocromo B. *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi*. Extração de DNA. *Leishmania* spp. kDNA. Repasto sanguíneo.

## ABSTRACT

LEONEL, J. A. F. Bioecological aspects of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area for visceral leishmaniasis in São Paulo state. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Nowadays, we have observed important changes in the transmission patterns of tegumentary (TL) and visceral leishmaniasis (VL) on endemic areas of Brazil. In addition, the VL advances rapidly to new areas on the past considered indene. The Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are small midges with great relevance in medical and veterinary sciences, as they are vectors of viruses, *Bartonella bacilliformis* and mainly *Leishmania* spp. The studies on Phlebotomine sandflies are fundamental to improve the comprehension of complex leishmaniasis epidemiology, revealing biological aspects of these vectors and its relationships with the parasite and its reservoirs. Molecular approaches have been included in these studies and have proven to be powerful tools for research about these dipterans. The aim of this work was to investigate the bioecological aspects of Phlebotomine sandflies on a TL and VL endemic area of São Paulo state, Brazil. Thus, an entomological survey was conducted to describe the fauna, its seasonality, rate of positive PCR by *Leishmania* spp. DNA and blood meals of sandflies in the study area. The insects were screened, identified and the thorax and abdomen of the females sampled submitted to DNA extraction and then PCR for the detection of Kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania* spp. parasites. Next, DNA samples from engorged, partially engorged and gravid females were submitted to PCR amplification of the mitochondrial cytochrome B gene (CYT-B) of vertebrates. Amplified products in CYT-B reactions were purified and subjected to sequencing. The sequences found were compared in a database GenBank, to identify the vertebrate species involved in the blood meal of the female sandflies. By employing molecular tools, this work also analyzed the performance of some DNA extraction methods from individual samples of thorax and abdomen of females of these insects. In our study, twelve species of sandflies were found, among proven and suspected vectors in the TL and VL epidemiological cycles. No seasonal patterns were observed between climatic factors studied (temperature, relative humidity and rainfall) and the fauna of these insects, captured with CDC light traps. Regarding DNA extraction methods, commercial kits are a good option for this type of sample. However, in house methods based on phenol-chloroform/isoamyl alcohol or *NaCl*/alcohol showed better results. Molecular analyzes revealed one non-engorged *Ev. (Ald.) carmelinoi* female PCR positive by *Leishmania* spp. kDNA. Blood meal



identification showed swine, humans, dogs, cattle, chickens and opossums as vertebrate hosts of sandflies in the study area. The implications of these findings are discussed in two scientific articles submitted for evaluation in journals of the area.

**Keywords:** Blood meals. Cytochrome B. *Evandromyia (Aldomyia) carmelinoi*. DNA extraction. kDNA *Leishmania* spp.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxonomia de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> .....	32
Figura 2 – Ciclo biológico de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> .....	37
Figura 3 – Desenvolvimento de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> dentro de um vetor flebotomíneo competente .....	37
Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento de formas imaturas de <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> : (A) ovos; (B) larva de 1º estágio (L1), (C) larva de 2º estágio (L2), (D) larva de 3º estágio (L3), (E) larva de 4º estágio (L4) e (F) pupa .....	45
Figura 5 – Adultos de <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> machos (A) e fêmeas (B) capturados nesse trabalho .....	45

## LISTA DE MAPAS

Mapa 1 – Casos de leishmaniose tegumentar, por estado e município de infecção, registrados no Brasil e no estado de São Paulo entre os anos de 2008 e 2018 .....	28
Mapa 2 – Casos de leishmaniose visceral, por estado e município de infecção, registrados no Brasil e no estado de São Paulo entre os anos de 2008 e 2018 .....	31
Mapa 3 – Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> spp. responsáveis por casos de LT e LV no Brasil.....	34
Mapa 4 – Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos considerados vetores comprovados de <i>Leishmania</i> spp. no Brasil .....	40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de flebotomíneos incriminados como vetores comprovados ou suspeitos* na transmissão de <i>Leishmania</i> spp. no Brasil.....	39
Quadro 2 – Espécies de mamíferos selvagens e sinantrópicos incriminados como potenciais reservatórios de <i>Leishmania</i> spp. no Brasil.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**cPCR:** Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

**CYT-B:** Gene Citocromo B

**ELISA:** Ensaio de Imunoabsorbância Ligada a Enzima

**ITS-1:** Internal Transcribed Spacer 1

**ITS-2:** Internal Transcribed Spacer 2

**kDNA:** DNA do Kinetoplasto

**LT:** Leishmaniose Tegumentar

**LV:** Leishmaniose Visceral

**MP:** Matriz Peritrófica

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**OPAS:** Organização Pan-Americana da Saúde

**qPCR:** PCR Quantitativa em Tempo Real

**PCR-RFLP:** PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

**PNOC:** Gene Prepronociceptina

**rDNA:** DNA Ribossomal

**SFM:** Sistema Fagocítico Mononuclear

**VP:** Vacúolo Parasitóforo

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.</b>	<b>Leishmanioses.....</b>	<b>25</b>
2.1.1.	Leishmaniose tegumentar .....	26
2.1.2.	Leishmaniose visceral.....	28
2.1.3.	Parasita.....	31
2.1.4.	Ciclo biológico .....	35
2.1.5.	Vetor .....	37
2.1.6.	Hospedeiros vertebrados.....	40
<b>2.2.</b>	<b>Flebotomíneos.....</b>	<b>43</b>
2.2.1.	Aspectos gerais .....	43
2.2.2.	Biologia de flebotomíneos.....	43
2.2.3.	Sistemática de Phlebotominae .....	46
2.2.4.	Estudos de fauna de flebotomíneos .....	47
2.2.5.	Estudos de sazonalidade de flebotomíneos .....	48
2.2.6.	Estudos de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos.....	49
2.2.7.	Estudos de identificação de hábitos alimentares de flebotomíneos.....	50
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
3.1.	Objetivo geral .....	51
3.2.	Objetivos específicos .....	51
<b>4.</b>	<b>ARTIGO 1 - ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSES: SAZONALIDADE, DETECÇÃO DE DNA DE <i>Leishmania</i> spp. E HÁBITOS ALIMENTARES .....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>ARTIGO 2 - EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS INDIVIDUAIS DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE): QUAL O MELHOR MÉTODO?.....</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são importantes doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS], 2016) que desde suas descrições iniciais, despertam a atenção da comunidade científica, e são focos de inúmeras pesquisas em diversos países, principalmente, naqueles onde elas ocorrem. São antropozoonoses que acometem, em sua maioria, populações carentes de países em desenvolvimento, onde possuem grande importância em saúde pública e veterinária (ROSS, 1903, DESJEUX, 2004; MARCUSSI et al., 2013; OMS, 2016). Em humanos apresentam basicamente sob duas formas clínicas, a leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (SARAVIA et al., 1989; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; GOTO; LINDOSO, 2012).

Nas Américas, uma série temporal de casos registrados de LT indica uma redução contínua dos casos humanos da doença até 2015 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE [OPAS], 2017), redução que pode estar associada a mudanças climáticas como *El Niño* e *La Niña* (CARDENAS et al., 2006). Contudo continua sendo um grave problema de saúde pública, acometendo um número expressivo de pessoas no continente, com o Brasil reportando a maior número de casos humanos (OPAS, 2017). O padrão epidemiológico de transmissão da LT tem sofrido uma significativa mudança, de uma doença relacionada a matas e florestas, há alguns anos começa a se estabelecer nas zonas rurais e periurbanas de todo o país (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010). No Estado de São Paulo, a LT é conhecida desde 1884, com sua transmissão ocorrendo em áreas florestais com intenso desmatamento (SOUZA, 2017), mas que atualmente é considerada endêmica em 460 municípios (BRASIL, 2019a).

Com relação a LV, apesar do número de casos humanos estar estável nos últimos anos, tem se observado uma expansão geográfica da doença nas Américas, principalmente, em países como a Argentina, Brasil e Paraguai (OPAS, 2017). Concomitantemente, ocorre um aumento na taxa de letalidade da doença na região (OPAS, 2017). De modo geral, apesar dos esforços na vigilância e controle, nos últimos anos, o mundo tem presenciado o aumento dos casos da infecção (WERNECK, 2010). No Brasil essa tendência também é observada, sendo atualmente considerado como um

país com transmissão de LV em expansão (MARCONDES; ROSSI, 2013; OPAS, 2017). No estado de São Paulo, a porta de entrada da LV foi a região noroeste, no fim do século XX e desde então, vem se disseminando para todo o estado (CARDIM et al., 2013). Atualmente, 103 municípios do estado apresentam casos humanos autóctones de LV (OLIVEIRA et al., 2019).

Em 1980, o Brasil implementou o programa de ações e vigilância da LT, e vem, desde então, tentando conter a disseminação da doença, apesar de entender que o controle da enfermidade é difícil no país (BRASIL, 2010). Dificuldade que reside no fato da doença, apresentar no país, uma diversidade de agentes etiológicos, de reservatórios e de vetores (BRASIL, 2010). Além disso, possui diferentes padrões de transmissão e um conhecimento, ainda, limitado sobre a epidemiologia da doença (BRASIL, 2010). Também na década de 80, o país começou a adotar medidas para o controle da LV, como por exemplo, a eutanásia de cães soropositivos em áreas endêmicas e o controle da população do vetor, através de pulverização de inseticidas (BRASIL, 2014). Entretanto as estratégias de controle adotadas não estão sendo eficientes para a redução do número dos novos casos e nem conter a disseminação da doença (LOPES et al., 2018). De fato, desde os anos 80 observa-se um aumento no número de casos humanos de LV reportados (BRASIL, 2014). Dessa forma a importância da LV no contexto da saúde pública tem aumentado nas últimas décadas, muito em virtude, da sua expansão geográfica e urbanização (DESJEUX, 2004; SÃO PAULO, 2006). Relacionadas às modificações ambientais, como os processos migratórios, à interação e mobilização de reservatórios silvestres e domésticos para áreas livres, e a adaptação do vetor ao peridomicílio (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). No estado de São Paulo, a expansão da doença é concomitante à adaptação do vetor em zonas urbanas e o aumento do número de casos caninos de LV (CAMARGO-NEVES, 2004; CASANOVA et al., 2015).

Segundo Quinnell e Courtenay (2009) a ineficiência dos métodos de controle da LV e consequente aumento na expansão dos casos, podem ser explicados pela baixa sensibilidade no diagnóstico de reservatórios assintomáticos, possibilidade de haver outras formas de transmissão ou ainda presença de outros reservatórios da doença. Esse fato, aliado à complexidade epidemiológica da LT no Brasil (BRASIL, 2010; LAINSON et al., 2010), corroboram a disseminação e urbanização das leishmanioses no país.



Os flebotomíneos, dípteros hematófagos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são a principal forma de transmissão do parasita para o homem e para outros mamíferos (KILLICK-KENDRICK, 1999). Atualmente, cerca de 1.000 espécies foram descritas em todo o Mundo, com 530 delas ocorrendo nas Américas e desses, 265 no Brasil (SHIMABUKURO et al., 2017; GALATI, 2018). No estado de São Paulo, 69 espécies de flebotomíneos já foram registradas em 32,5% dos municípios, dentre elas, vetores de LT e LV (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

A adoção de medidas de controle eficientes depende do amplo conhecimento de todos os parâmetros dinâmicos da infecção entre os vários participantes da cadeia epidemiológica da doença (LOPES et al., 2018). Apesar do avanço do conhecimento sobre a doença, pouco se conhece sobre a transmissão de *Leishmania* spp. entre os hospedeiros mamíferos e vetores (ROQUE; JANSEN, 2014). Nesse sentido, os estudos sobre as relações biológicas entre vetores, hospedeiros e patógenos constituem uma importante ferramenta epidemiológica, capaz de avaliar o potencial de transmissão vetor, presença de possível reservatório incriminado e elucidação do ciclo de transmissão natural em uma área, gerando adoção de medidas de controle mais efetivas (KILLICK-KENDRICK, 1990; 1999; MICHALSKY et al., 2002; ALEXANDER; MAROLI, 2003; DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2005; ABBASI et al., 2009; BAUM et al., 2015). Em específico, o estudo dos flebotomíneos nos ajuda a entender como cada espécie interage e como ocorre transmissão das leishmanioses em uma área (BARATA et al., 2005). Nesse campo, pesquisas que investigam a fauna de flebotomíneos (SPADA et al., 2014), sua sazonalidade (ALMEIDA et al., 2010), a taxa de infecção natural dos vetores (SARAIVA et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2017) e os hábitos alimentares desses insetos (CARVALHO et al., 2017), têm sido amplamente realizados e vem se consolidando como uma importante ferramenta para melhor entender a epidemiologia e a transmissão da doença em uma região.

Como dito, as alterações devido a atividade humana, tem levado nos últimos anos a mudanças no padrão de transmissão da LT e LV (SHIMABUKURO; GALATI, 2011). Muito em virtude, dentre outras causas, a alterações na fauna sinantrópica de uma área (CRANSTON, 2005). Os estudos dos flebotomíneos são impulsionados pelo seu papel fundamental na epidemiologia da doença (SARAIVA et al., 2006). Assim, esses trabalhos têm demonstrado o dinamismo dessa população de insetos, e chamado a atenção para a necessidade de vigilância entomológica continua para conter a disseminação da doença (SHIMABUKURO; GALATI, 2011). Nesse contexto,

acreditamos na importância de identificar a fauna de flebotômíneos, a sazonalidade, a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. e as preferências alimentares desses insetos em área endêmica para LV no estado de São Paulo. Dessa forma, podemos contribuir com informações sobre a fauna e bioecologia dos flebotômíneos nas áreas de estudo, de modo a melhorar o entendimento da epidemiologia das leishmanioses na região e embasar medidas de vigilância e controle adequadas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Leishmanioses**

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias, causada por protozoários flagelados que infectam diversos mamíferos, inclusive o homem (DESJEUX, 2004; OMS, 2016). São epidemiologicamente classificadas como antroponozoonoses e causadas por protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903, OMS, 2016). Sendo assim, sua importância em termos médicos e veterinários é bastante significativa, constituindo um problema global de saúde pública, especialmente em países tropicais e subtropicais (DESJEUX, 2004; MARCUSSI et al., 2013). São doenças endêmicas em 98 países e 3 territórios (ALVAR et al., 2012), tais como o leste e sudeste da Ásia, Oriente Médio, norte e leste da África, sul da Europa (Mediterrâneo) e Américas Central e do Sul (BRASIL, 2014; OMS, 2016). Acometendo, em sua maioria populações de carentes de países tropicais e subtropicais, as leishmanioses estão entre mais importantes doenças negligenciadas do mundo (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; WERNECK, 2010; MARCONDES; ROSSI, 2013). Calcula-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e a doença pelas diversas espécies do parasito (DESJEUX, 2004).

A doença apresenta, em humanos, basicamente dois padrões clínicos, classificados de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro, são eles: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (SARAVIA et al., 1989; GONTIJO; CARVALHO, 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; GOTO; LINDOSO, 2012).

### 2.1.1. Leishmaniose tegumentar

A LT é uma doença crônica, não contagiosa e infecciosa parasitária causada por diferentes espécies de *Leishmania* spp., que em humanos, acomete principalmente a pele e as estruturas cartilaginosas da nasofaringe de forma localizada ou difusa (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010). Sendo caracterizada por lesões nodulares ulcerativas, geralmente no local da picada do vetor flebotomíneo, que pode ou não apresentar cura espontânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Apesar de ser considerada a forma clínica mais branda da doença, pode apresentar graves lesões destrutivas e desfigurantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

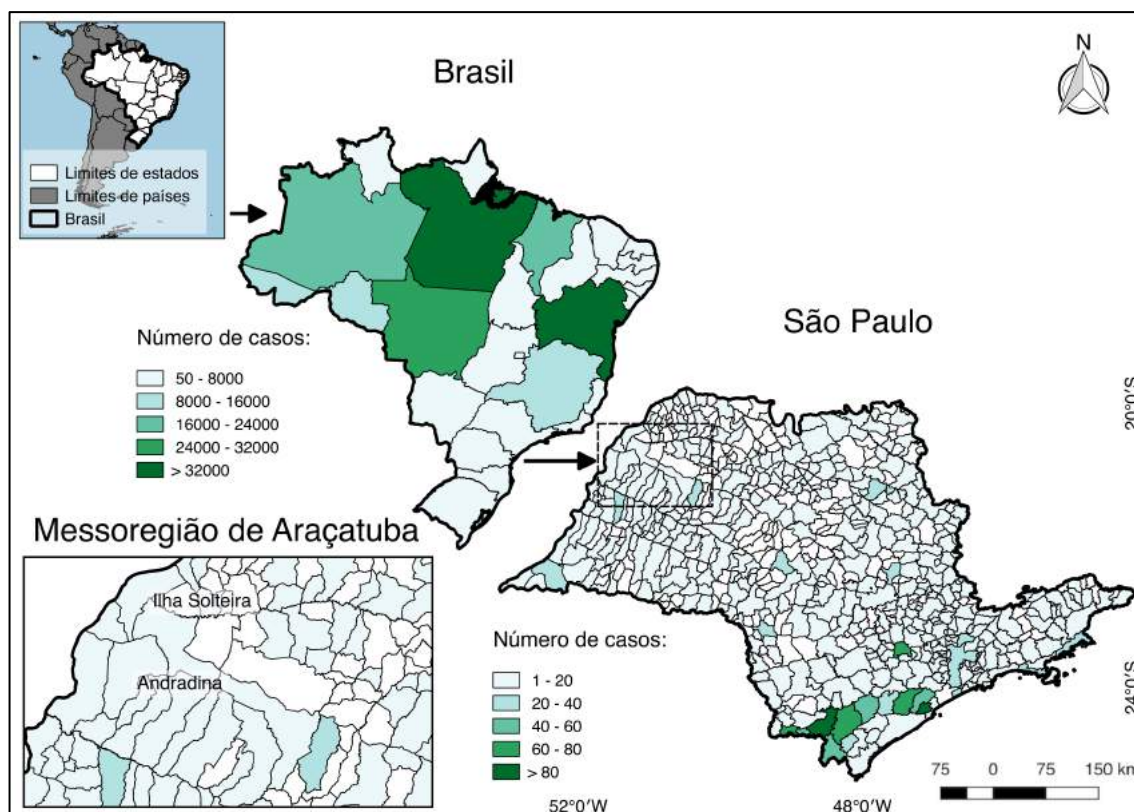
Estima-se que a cada ano, ocorra cerca de 600.000 a 1,2 milhões de novos casos de LT (ALVAR et al., 2012; OMS, 2019). Em 2017, mais de 95% dos casos de LT reportados ocorreram em 7 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque e Síria (OMS, 2019). Na América do Sul, a LT é endêmica em 18 países que apresentam intensidades de transmissão diferentes, variando de baixa a muito intensa (OPAS, 2017). O Brasil concentra a maior parte dos casos no continente, sendo em 2015, 70% dos 46.082 casos ocorrendo no país (OPAS, 2017).

No continente americano, a LT data do século I d.C., quando cerâmicas pré-colombianas, feitas por índios peruanos, foram encontradas (LAINSON; SHAW, 1988; LAINSON, 1997; CAMARGO; BARCINSKI, 2003). Os desenhos representavam seres humanos com mutilações de lábio e nariz, característico com a clínica da doença em sua forma mais grave, a leishmaniose mucocutânea (LAINSON; SHAW, 1988). No país, relatos da doença datam de 1827 por Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros em regiões do vale amazônico (PARAGUASSU-CHAVES, 2001). Sendo seguido por Cerqueira em 1855, identificando uma moléstia da pele como botão de Biskra (BASANO; CAMARGO, 2004). Contudo apenas em 1909, Lindenberg confirma a natureza dessas lesões ao encontrar formas de *Leishmania*, idênticas as descritas no velho Mundo, em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo (PESSÔA, 1982). Posteriormente Gaspar Vianna, o descreve com uma nova espécie, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, como o agente etiológico da popularmente conhecida “Úlcera de Bauru”, “Ferida Brava” ou “Nariz de Tapir” (SILVEIRA et al., 1997). Todos esses fatos históricos, demonstram a origem e endemicidade da LT nas Américas, bem como, no Brasil.

No nosso país, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todos os estados (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010). Tendo seu padrão epidemiológico de transmissão sofrido algumas mudanças (BRASIL, 2010). No passado, tida como uma zoonose de animais silvestres e seres humanos em contato com matas e florestas, a doença começa a se estabelecer em zonas rurais e em regiões periurbanas (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010). Muito em virtude a urbanização desordenada, com a exploração e desmatamento de matas e florestas, ecoturismo e adaptação dos vetores ao peridomicílio (BRASIL, 2010). No Brasil entre 2008 a 2018, 213.320 casos humanos de LT foram registrados nos 26 estados e no Distrito Federal (Mapa 1) (BRASIL, 2019a).

No Estado de São Paulo, LT é conhecida desde 1884, com sua transmissão ocorrendo em áreas florestais, relacionadas a ações antrópicas de desmatamentos para a expansão das plantações de café no século XIX e posteriormente, para a construção de rodovias e ferrovias no século XX (SOUZA, 2017). Contudo, houve na década de 50 um declínio nos casos registrados no estado, reemergindo na década de 80 (TOLEZANO, 1994). Atualmente, a doença está presente por todo o estado com surtos esporádicos ocorrendo em áreas rurais e periurbanas (SOUZA, 2017). Entre 2008 e 2018, o estado de São Paulo registrou 2.563 casos de LT em 409 dos seus 645 municípios (Mapa 1) (BRASIL, 2019a). Nas cidades de Andradina e Ilha Solteira (áreas desse estudo), pertencentes a mesorregião de Araçatuba, 13 e 3 casos humanos de LT foram registrados, respectivamente (Mapa 1) (BRASIL, 2019a).

Mapa 1 – Casos de leishmaniose tegumentar, por estado e município de infecção, registrados no Brasil e no estado de São Paulo entre os anos de 2008 e 2018



### 2.1.2. Leishmaniose visceral

A LV é uma doença não contagiosa e infecciosa parasitária causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum*, responsável por uma manifestação sistêmica (STAUCH et al., 2011; BRASIL, 2014). Tendo, dois principais de ciclos de transmissão, o ciclo antroponótico e zoonótico (QUINNELL; COURTENAY, 2009; WERNECK, 2014). O ciclo antroponótico, aonde os seres humanos são os únicos e mais importantes reservatórios do parasita, ocorrendo na Índia e África Central (WERNECK, 2014). Por outro lado, o ciclo zoonótico, possui o envolvimento de animais domésticos e silvestres, ocorrendo no Mediterrâneo, Américas e Ásia Central (WERNECK, 2014). Para ambos os ciclos, a doença é caracterizada pela infecção do sistema reticulo-endotelial fagocitário, que incluem órgãos como fígado, baço e linfonodos (STAUCH et al., 2011). Geralmente causando graves quadros de febre alta e hiperpigmentação cutânea (originando o nome popular, Kala-azar), associados com fadiga, perda de peso e hepato-esplenomegalia (STAUCH et al., 2011).

Dessa forma, a LV é considerada a forma mais grave da doença e que quando não tratada apresenta alta letalidade (STAUCH et al., 2012).

Pela sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2014). Estima-se que a cada ano, ocorram cerca de 50.000 a 400.000 novos casos de LV (ALVAR et al., 2012; OMS, 2019). Segundo a OMS (2019), no ano de 2017, mais de 95% dos casos de LV reportados estavam concentrados em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Na América do Sul, apesar da doença estar presente em pelo menos 12 países americanos, a maioria dos casos de LV (cerca de 96%) ocorrem no Brasil (OPAS, 2017), especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2014). Tal informação, torna-se impressionante frente ao expressivo número de casos de LV subnotificados no país (MARCONDES; ROSSI, 2013).

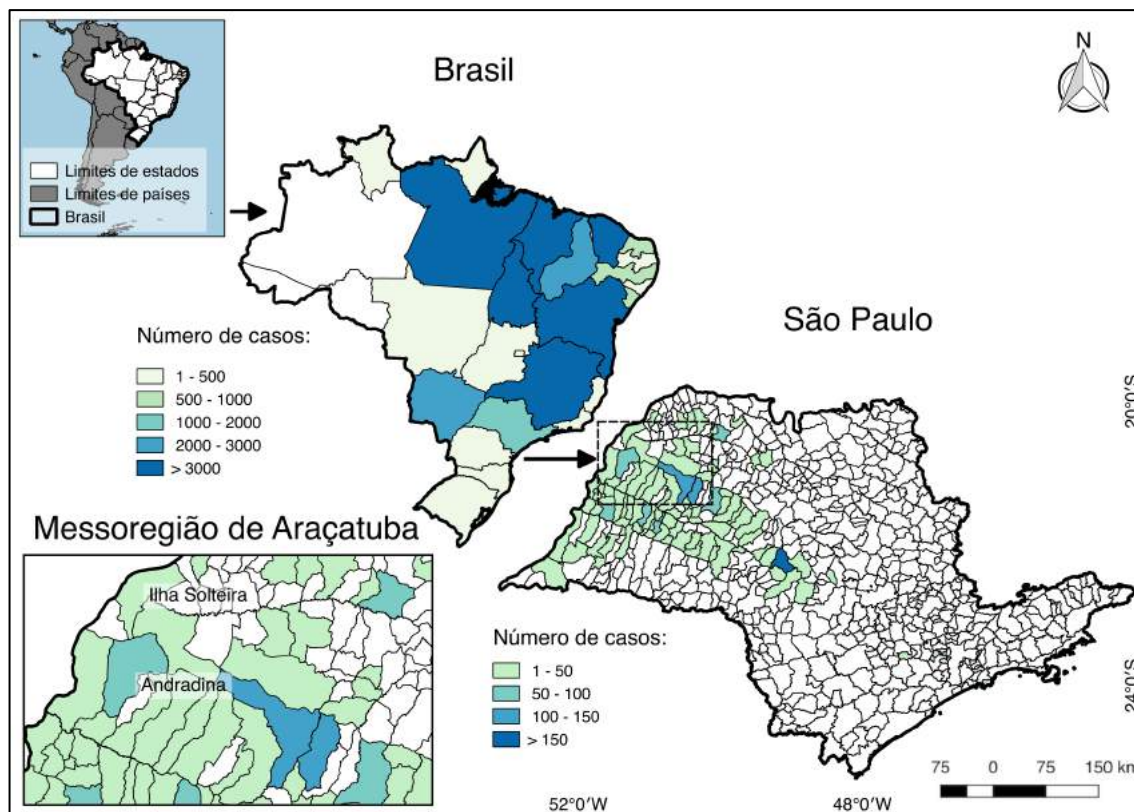
As primeiras referências de LV na América do Sul, são do início do século XX com Carlos Chagas, ao encontrar, no vale do Rio Amazonas, pacientes com esplenomegalia sem causa justificada (MARCONDES; ROSSI, 2013). Nos anos seguintes, Migone identificou o parasita durante uma necropsia em um indivíduo proveniente do estado do Mato Grosso (ALENCAR et al. 1991). Apenas em 1934, a doença é confirmada como autóctone e de alta ocorrência nas Américas, por Pena (PENA et al., 1934; MARCONDES; ROSSI, 2013). Finalmente em 1936, Evandro Chagas classifica a *Leishmania chagasi* como uma nova espécie do gênero *Leishmania* (CHAGAS et al., 1937; CUNHA; CHAGAS, 1937). Posteriormente reclassificada em *L. (L.) infantum chagasi* (MAURICIO et al., 1999; LAINSON; SHAW, 2005; KUHLS et al., 2011).

Desde então, a LV tem apresentado mudanças importantes no seu padrão de transmissão em diversas partes do mundo e no Brasil, geralmente, associadas as alterações sociais e geográficas da paisagem (CERBINO-NETO; WERNECK; COSTA, 2009; BRASIL, 2014). Assim, a doença tem mostrado grande expansão geográfica no território brasileiro (MARCONDES; ROSSI, 2013). Inicialmente, tida como uma doença rural do nordeste brasileiro, nos últimos 40 anos houve um aumento da sua ocorrência em grandes cidades do país (CERBINO-NETO; WERNECK; COSTA, 2009; WERNECK, 2014). Dessa forma, o Brasil é classificado, quanto ao cenário epidemiológico da LV em país com transmissão em expansão, juntamente com a

Argentina e o Paraguai (OPAS, 2017). Entre 2008 e 2018, o país registrou 37.575 casos humanos de LV em 23 estados e no Distrito Federal (Mapa 2) (BRASIL, 2019b). Destacam-se estados da região sul que antes eram considerados indene para LV humana e canina até novembro de 2008 (Mapa 2) (MARCONDES; ROSSI, 2013).

No estado de São Paulo, os primeiros registros da doença ocorrem em 1999 nas cidades de Araçatuba e Birigui (CARDIM et al., 2016). Nos anos seguintes a doença foi se expandido com casos descritos em várias cidades paulistas, interessadamente, em sua maioria, cidades cortadas pela rodovia Marechal Rondon e suas rodovias subjacentes (CARDIM et al., 2016). Assim, tem-se que a porta de entrada da LV no estado de São Paulo foi a região noroeste e vem se disseminando para a região sudeste do estado, acompanhando rodovia Marechal Rondon, a ferrovia Novoeste e a construção do gasoduto Bolívia-Brasil (CARDIM et al., 2013). Um segundo eixo de disseminação, foi caracterizado, sendo sua disseminação do noroeste para sul do estado (regiões de Presidente Prudente e Marília), e no sentido norte (região de São José do Rio Preto) (CARDIM et al., 2013). Entre 2008 e 2018, o estado de São Paulo registrou 1.766 casos humanos de LV em 93 municípios paulistas, classificados como áreas de transmissão humana da doença no estado (Mapa 2) (BRASIL, 2019b; OLIVEIRA et al., 2019). Nas cidades de Andradina e Ilha Solteira (áreas desse estudo), pertencentes a mesorregião de Araçatuba (porta de entrada da LV no estado), 52 e 7 casos humanos de LV foram registrados no mesmo período, respectivamente (Mapa 2) (BRASIL, 2019b).

Mapa 2 – Casos de leishmaniose visceral, por estado e município de infecção, registrados no Brasil e no estado de São Paulo entre os anos de 2008 e 2018

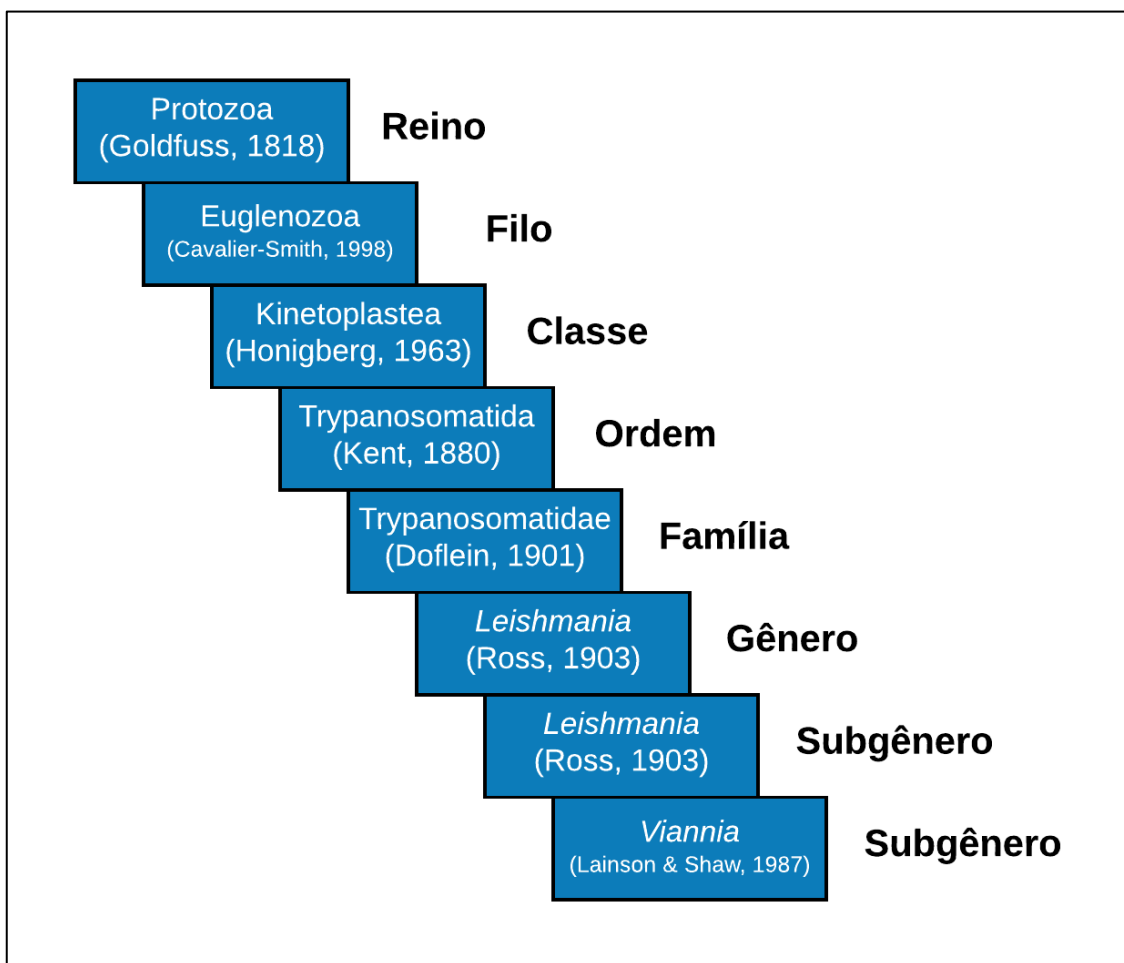


Fonte: Mapa elaborado pelo autor, adaptado de Brasil (2019b), considerando os municípios do estado de São Paulo com ocorrência de transmissão humana de LV, de acordo com Oliveira et al. (2019). Foi utilizado o software QGIS 2.18 “Las Palmas” (QGIS Development Team, 2016) com *shapefiles* de livre acesso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2018).

### 2.1.3. Parasita

Taxonomicamente, os agentes etiológicos das doenças leishmanioses são classificados segundo Levine et al., (1980) (Figura 1).



Figura 1 – Taxonomia de parasitas do gênero *Leishmania*

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Levine et al. (1980).

O gênero *Leishmania* dá origem a dois complexos fenotípicos, agrupados como dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que diferem quanto ao desenvolvimento no vetor, crescimento em meio de cultivo e progressão da doença em cobaias experimentalmente infectadas (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI, 1992; GREENE, 2006).

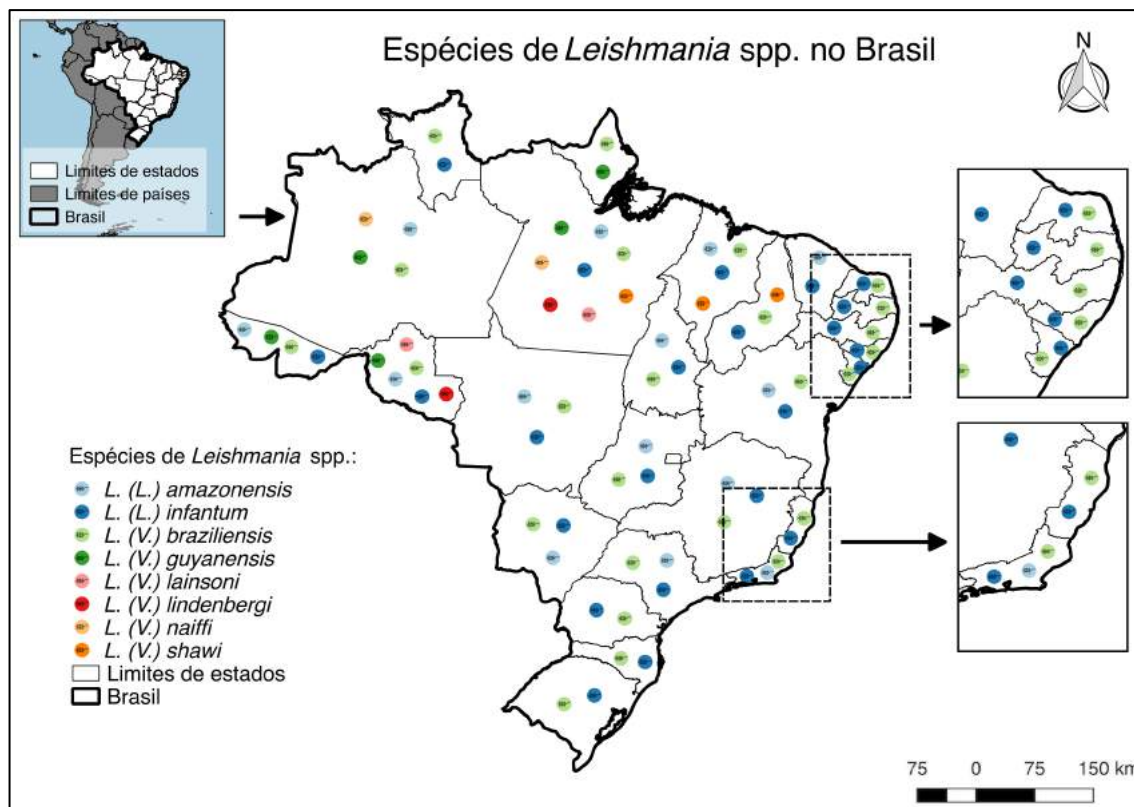
O subgênero *Leishmania* é caracterizado por espécies cujo desenvolvimento se dá no intestino anterior e médio do vetor (LAINSON, 2010). Além disso, crescem facilmente em meio de cultivo e são responsáveis por provocar grandes lesões em cobaias experimentalmente infectadas (MARZOCHI, 1992). Esse subgênero tem como espécie-tipo *L. (L.) donovani* Laveran & Mesnil, 1903 e composto pelas espécies: *L. (L.) chagasi* Cunha & Chagas, 1937; *L. (L.) enriettii* Muniz & Medina, 1948; *L. (L.) mexicana* Biagi, 1953 emend. Garnham, 1962; *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972; *L. (L.) aristidesi* Lainson & Shaw, 1979; *L. (L.) venezuelensis* Bonfante-Garrido,

1980; *L. (L.) garnhami* Scorza et al, 1979; *L. (L.) pifanoi* Medina & Romero, 1959; *L. (L.) hertigi* Herrer, 1971; *L. (L.) deanei* Lainson & Shaw, 1977 (LAINSON, 2010).

Já o subgênero *Viannia* é caracterizado por espécies cujo desenvolvimento se dá no intestino posterior do vetor, ocorrendo uma migração dos parasitas para os intestinos médio e anterior do vetor (LAINSON, 2010). Contrariamente, possuem desenvolvimento pobre em cultura e apresentam progressão lenta da doença em hamsters experimentalmente infectados (MARZOCHI, 1992). A espécie-tipo desse grupo é a *L. (V.) braziliensis* Vianna, 1911, emend Matta, 1916, incluindo as espécies *L. (V.) peruviana* Velez, 1913; *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954; *L. (V.) panamensis* Lainson & Shaw (LAINSON, 2010). As espécies deste subgênero são conhecidas apenas no Novo Mundo (LAINSON, 2010).

Atualmente, das 54 espécies descritas em todo o mundo (sem considerar as sinônimas), 31 espécies são conhecidas por acometer mamíferos e 21 consideradas patogênicas para os seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016; AKHOUNDI et al., 2017). No Brasil, 7 espécies são responsáveis por causar LT, seis pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*, são elas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2010). Sendo, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses*, as mais importantes espécies envolvidas nessa forma da doença no país (PASSOS et al, 1999; BRASIL, 2010). A distribuição geográfica das diversas espécies de *Leishmania* spp. causadoras de LT no Brasil está demonstrada no Mapa 3 (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010).

Mapa 3 – Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* spp. responsáveis por casos de LT e LV no Brasil



Fonte: Mapa elaborado pelo autor, adaptado de Basano e Camargo (2004), Azeredo-Coutinho et al. (2007), Tolezano et al. (2007), Brasil (2010; 2019b), utilizando o software QGIS 2.18 “Las Palmas” (QGIS Development Team, 2016) com *shapefiles* de livre acesso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2018).

Quanto à LV, duas espécies são incriminadas na epidemiologia da doença e são pertencentes ao subgênero *Leishmania*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, sendo associadas aos ciclos antroponótico e zoonótico da doença, respectivamente (MICHALICK; GENARO, 2005; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Nas Américas, apenas o ciclo zoonótico tendo *L. (L.) infantum* está presente. A distribuição geográfica de *L. (L.) infantum* no Brasil é apresentada no Mapa 3 (BRASIL, 2019b).

No Brasil, desde a sua descrição por Cunha e Chagas (1937), acreditou-se que a espécie *L. (L.) chagasi* era a responsável pela LV no país, diferenciando a da *L. (L.) infantum* presente no Velho Mundo (SILVEIRA; CORBETT, 2010). Contudo, após estudo molecular abrangente entre cepas isoladas nas Américas, principalmente no Brasil, e cepas encontradas no Mediterrâneo, os pesquisadores concluíram que *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* na verdade eram a mesma espécie (MAURICIO et al., 1999; KUHLS et al., 2011). Contudo, Lainson e Shaw (2005) propuseram uma nova

classificação do parasita a nível de subespécie, *L. (L.) infantum chagasi*, devido a características particulares na cadeia epidemiológica da doença.

#### 2.1.4. Ciclo biológico

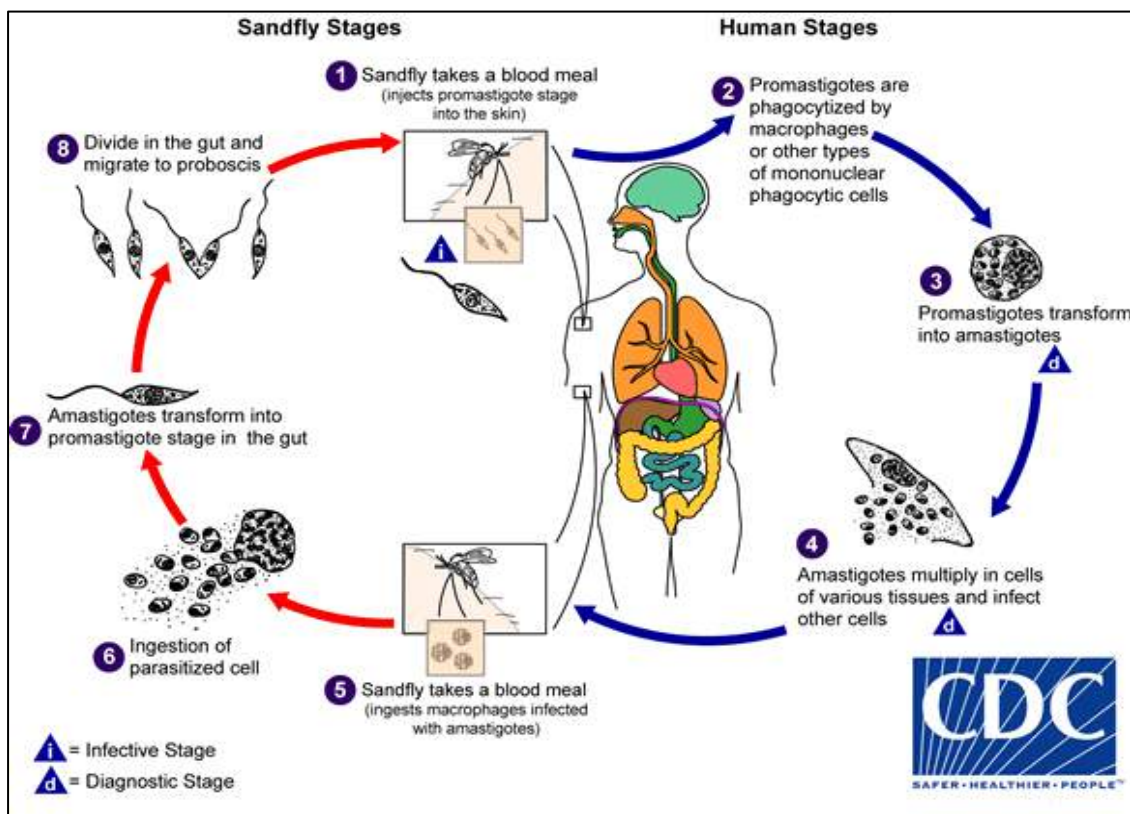
O parasita possui ciclo de vida heteroxeno, apresentando duas formas conforme o hospedeiro, a forma promastigota (com cerca de  $15 \times 2 \mu\text{m}$ ), presente no hospedeiro invertebrado e a amastigota (com cerca de  $3 \times 2$  a  $6 \times 4 \mu\text{m}$ ), no hospedeiro vertebrado (MARZOCHI, 1992; DUNAISKY, 2006; DOSTÁLOVA; VOLF, 2012). A principal forma de transmissão do parasita para o homem e para outros mamíferos é pela picada de dípteros hematófagos denominados flebotomíneos (Figura 2) (REY, 2001; BATES; ROGERS, 2004; BRASIL, 2014).

O ciclo tem início no hospedeiro vertebrado, com os parasitas (em sua forma amastigota) infectando as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como monócitos, histiócitos e macrófagos, no interior de fagolisossomos transformados em vacúolos parasitóforos (VP) (Figura 2) (MARZOCHI, 1992; REY, 2001; HANDMAN; BULLEN, 2002; BATES, 2007). A de se considerar, que normalmente as formas amastigotas ingeridas pelo vetor não estão presentes na circulação periférica, mas sim na pele do hospedeiro vertebrado, e que obviamente, os parasitas presentes em órgãos do sistema reticuloendotelial (como o fígado, baço e medula óssea) não são acessíveis ao vetor (BATES, 2007). Para se alimentar, o vetor insere seu aparelho bucal (como serras) na pele do hospedeiro vertebrado produzindo um dano tecidual (LANE, 1993), responsável por liberar macrófagos infectados que são então, ingeridos pelo flebotomíneo (BATES, 2007). A própria saliva do vetor, aumenta em três vezes a migração de células de defesa, primeiramente neutrófilos, seguidos de macrófagos, monócitos e células dendríticas, até o local da ferida (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). Dessa forma, as fêmeas de flebotomíneos, quando se alimentam em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerem as formas amastigotas de *Leishmania* spp., presentes no interior dos macrófagos (Figura 2) (MARZOCHI, 1992; REY, 2001).

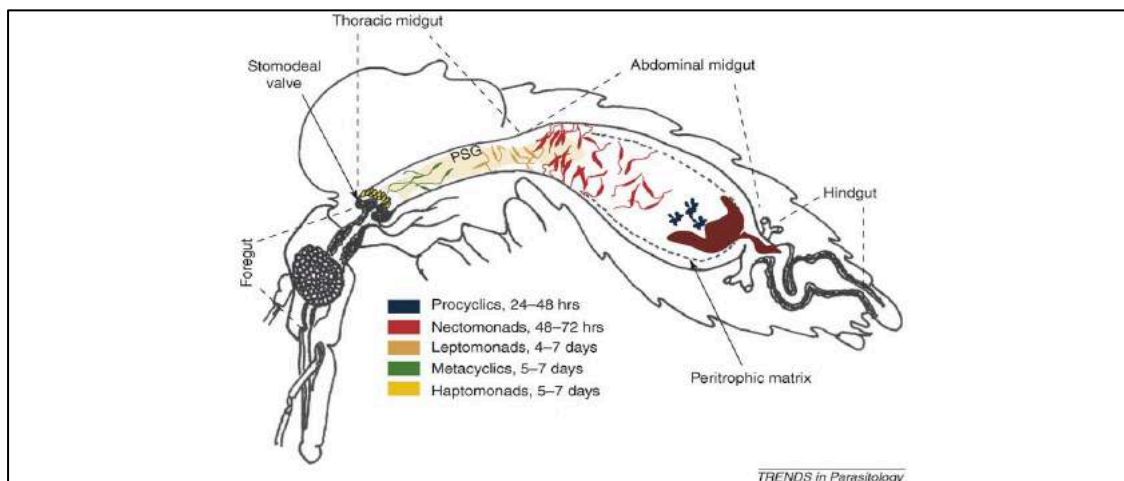
Uma vez no interior do hospedeiro invertebrado, mudanças no pH e temperatura vão desencadear o desenvolvimento das formas amastigotas para as formas seguintes, caracterizadas por diferenças não apenas morfológicas, mas de alterações funcionais que vão garantir a sobrevivência no vetor (Figura 3) (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006). Primeiramente, as amastigotas se diferenciam em promastigotas

pró-cíclicas, caracterizadas por tamanho pequeno, flagelos curtos e movimentação lenta (KAMHAWI, 2006). Essas formas, dão início a primeira replicação no vetor no interior da matriz peritrófica (MP) por essa razão, são resistentes ao ataque das enzimas digestivas do vetor (Figura 3) (KAMHAWI, 2006). Em seguida, as promastigotas pró-cíclicas se diferenciam em nectomonas, caracterizadas por seu tamanho maior e mais delgadas que saem da MP e vão se ancorar no epitélio de revestimento do intestino do vetor e dão início a migração para o intestino torácico (Figura 3) (KAMHAWI, 2006). Após o segundo ciclo de replicação, as nectomonas dão origem as leptomonas (Figura 3) (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006). As nectomonas são as formas que marcam a fase de estabelecimento da infecção após a completa digestão do sangue e defecação, assim, sua presença caracteriza um vetor verdadeiro de *Leishmania* spp. (BATES, 2007). Por fim, ancoradas na válvula estamodeal, as haptomonas, formas imóveis com flagelo curto lembrando o formato de uma folha são encontradas (Figura 3) (KAMHAWI, 2006). Além disso, as promastigotas metacíclicas, formas móveis com um pequeno corpo celular e um flagelo longo são encontradas atrás da válvula (Figura 3) (KAMHAWI, 2006). Essa última forma, considerada o estágio infeccioso do parasita, sendo altamente especializadas na infecção do hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006).

Todo esse desenvolvimento leva de 4 a 9 dias após o repasto sanguíneo dependendo da espécie de flebotômíneo vetor, ao fim desse período as formas metacíclicas presentes na válvula são responsáveis pelo seu mal funcionamento dificultando o repasto sanguíneo seguinte (MARZOCHI, 1992; REY, 2001; KAMHAWI, 2006). Essa dificuldade devido à oclusão da válvula pela intensa colonização do parasita, leva ao regurgitamento das formas metacíclicas durante um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado não infectado (MARZOCHI, 1992; REY, 2001). Por fim, essas formas são fagocitadas pelas células do SFM, perdendo o flagelo e multiplicando-se em formas amastigotas no interior do VP, fechando o ciclo (Figura 02) (MARZOCHI, 1992; REY, 2001).

Figura 2 – Ciclo biológico de parasitas do gênero *Leishmania*

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention [CDC] (2019).

Figura 3 – Desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum* dentro de um vetor flebotomíneo competente

Fonte: Kamhawi (2006).

### 2.1.5. Vetor

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e para outros mamíferos é pela picada de fêmeas de dípteros hematófagos denominados flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui, asa dura, asa branca, cangalhinha, arrupiado, tatuquira ou em inglês, *Phlebotomine sandflies* (mosquito da cor de areia) (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2014; GALATI et al., 2017). São insetos extremamente pequenos medindo de 1,5 a 2 milímetros de comprimento, com o corpo piloso, pernas longas e delgadas e de coloração castanho claro (YOUNG; DUNCAN, 1994; BASANO; CAMARGO, 2004). Seu voo é saltitante, e quando em repouso, mantem as asas eretas, ao contrário dos outros dípteros (BASANO; CAMARGO, 2004). Tanto as fêmeas como os machos alimentam-se de fontes naturais de açúcar (AFONSO; ALVES-PIRES, 2008), porém apenas as fêmeas se alimentam de sangue o que lhes proporciona uma nutrição adequada para a produção e maturação dos seus ovos (ROSYPAL et al., 2003).

Dois gêneros são identificados como principais vetores de *Leishmania* spp., o *Phlebotomus* spp., no Velho Mundo e *Lutzomyia* spp., no Novo Mundo (MAROLI et al., 2013). Nas Américas, 530 espécies de flebotomíneos já foram descritas, cerca de 60 (nas Américas) e 19 (no Brasil) são incriminadas na transmissão de *Leishmania* spp. (RANGEL; LAINSON, 2003; SHIMABUKURO et al., 2017; GALVIS-OVALLOS et al., 2017). Contudo poucas espécies são consideradas vetores comprovados do parasita, uma vez que para tal, parâmetros de capacidade vetorial e competência vetorial devem ser analisados (REISEN, 1989; KILLICK-KENDRICK, 1990; GALVIS-OVALLOS et al., 2017). Apenas cumprindo esses parâmetros uma espécie pode ser considerada um vetor comprovado e essencial para a manutenção do parasita no ambiente (READY, 2013; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Dessa forma, apenas seis espécies são consideradas vetores comprovados de LT: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Migonemyia (Migonemyia) migonei*, *Nyssomyia intermedia*, *Ny. umbratilis*, *Ny. whitmani* e *Psychodopygus wellcomei* a depender da espécie de *Leishmania* spp. envolvida (Quadro 1) (BRASIL, 2010). As espécies *Ny. antunesi*, *Ny. neivai*, *Pintomyia (Pintomyia) fischeri*, *Pi (Pin.) pessoai*, *Ps. ayrozai*, *Ps. paraenses*, *Ps. squamiventris* e *Trichophoromyia ubiquitalis* são incriminadas como vetores altamente suspeitos de LT (Quadro 1) (FORATTINI et al., 1972; SILVEIRA et al., 1991a; RANGEL; LAINSON, 2009; PITA-PEREIRA et al., 2009; BRASIL, 2010; LAINSON, 2010; PITA-PEREIRA et al., 2011). Por sua vez, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da LV no país, a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, considerado o principal vetor do parasita, e a *Lu. (Lu.) cruzi* incriminado por Galati et al. (1997) nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Quadro 1)

(BRASIL, 2014; GALATI, 2018). A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos, considerados vetores comprovados de *Leishmania* spp. no Brasil, está demonstrada no Mapa 4 (BRASIL, 2010; GALATI, 2018).

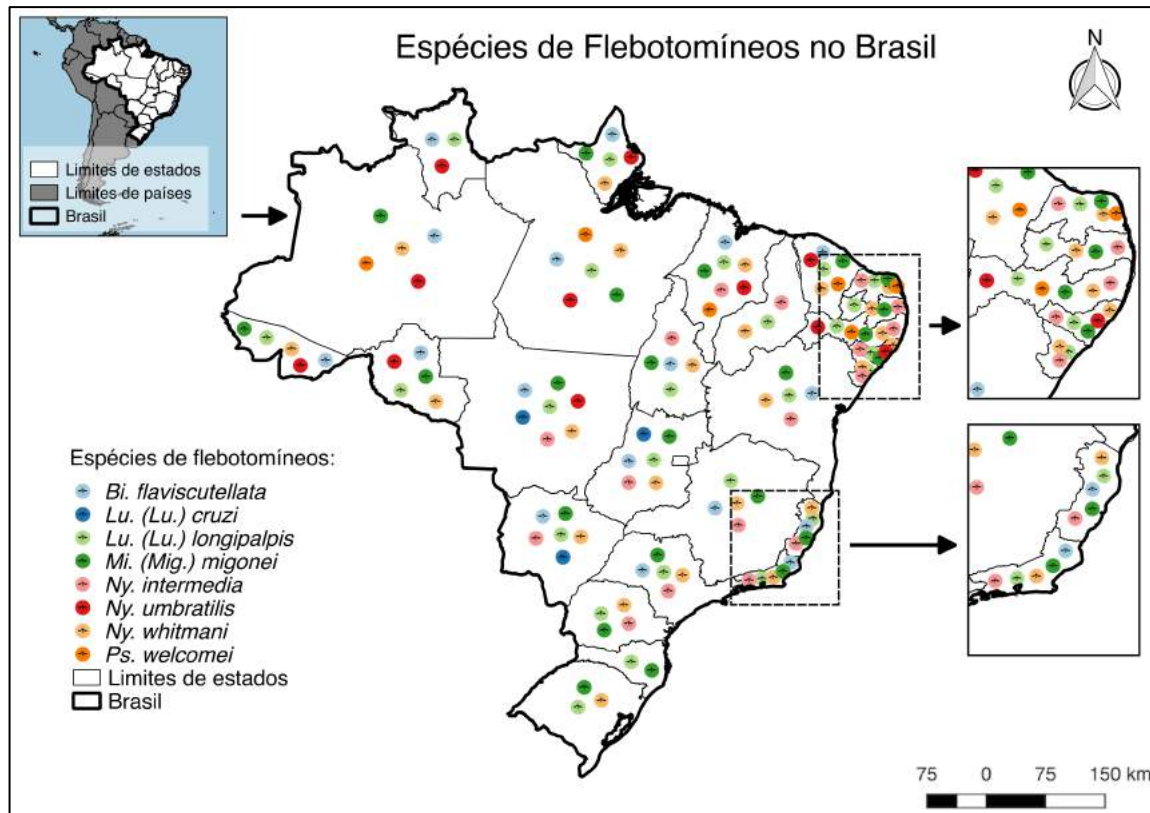
Quadro 1 – Espécies de flebotomíneos incriminados como vetores comprovados ou suspeitos\* na transmissão de *Leishmania* spp. no Brasil

<b>ESPÉCIE DE FLEBOTOMÍNEO</b>	<b>ESPÉCIE DE <i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<i>Bi. flaviscutellata</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LAINSON; SHAW (1968)
<i>Lu. (Lu.) cruzi</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	GALATI et al. (1997); BRASIL, 2014
<i>Lu. (Lu.) longipalpis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	BRASIL, 2014
<i>Mg. (Mig.) migonei</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	RANGEL; LAINSON (2009)
<i>Ny. antunesi*</i>	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	LAINSON (2010)
<i>Ny. intermedia</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	RANGEL; LAINSON (2009)
<i>Ny. neivai*</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	PITA-PEREIRA et al. (2009)
<i>Ny. umbratilis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	RANGEL; LAINSON (2009)
<i>Ny. whitmani</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> ; <i>L. (V.) shawi</i>	RANGEL; LAINSON (2009); LAINSON (2010)
<i>Pi. (Pin.) fischeri*</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	PITA-PEREIRA et al. (2011)
<i>Pi. (Pin.) pessoai*</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	FORATTINI et al. (1972)
<i>Ps. ayrozai*</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	LAINSON (2010)
<i>Ps. paraenses*</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	LAINSON (2010)
<i>Ps. squamiventris*</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	LAINSON (2010)
<i>Ps. wellcomei</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	RANGEL; LAINSON (2009)
<i>Th. ubiquitous*</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	SILVEIRA et al. (1991a)

Fonte: Elaborado pelo autor.



Mapa 4 – Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos considerados vetores comprovados de *Leishmania* spp. no Brasil



Fonte: Mapa elaborado pelo autor, adaptado de Brasil (2010) e Galati (2018), utilizando o software QGIS 2.18 “Las Palmas” (QGIS Development Team, 2016) com *shapefiles* de livre acesso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2018).

#### 2.1.6. Hospedeiros vertebrados

Os parasitas do gênero *Leishmania* são caracterizados por possuírem alta heterogeneidade genética e um grande ecletismo biológico, sendo capazes de infectar diversos mamíferos (ROQUE, JANSEN, 2014). Dessa forma seu ciclo biológico é complexo e dinâmico com características epidemiológicas regionais específicas (ASHFORD, 1996; ROTUREAU, 2006). Nas Américas, há relatos de infecção por *Leishmania* spp. em uma ampla variedade de espécies de mamíferos domésticos e selvagens pertencentes a sete ordens: Carnívora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Pilosa, Primata e Rodentia (ASHFORD, 1996; ALVAR et al., 2012; ROQUE; JANSEN, 2014). Sendo, os roedores, gambás, caninos, primatas e equinos os principais reservatórios de *Leishmania* spp. no continente (DUARTE et al., 2010). Entretanto, é importante observar que no complexo sistema parasita-hospedeiro, inúmeros variáveis estão presentes, como fatores relacionados ao próprio hospedeiro, ao parasita, a exposição e ao ambiente (CHAVES et al., 2007; TOMMASI et al., 2013; ROQUE; JANSEN, 2014). Assim, determinados hospedeiros de uma região, podem não

ter o mesmo papel epidemiológico em outras localidades (DESJEUX, 2004; MILLS E CHILDS, 1998; ROQUE; JANSEN, 2014).

Dentre as espécies domésticas, o cão (*Canis lupus familiaris*) é considerado hospedeiro reservatório principal no ciclo da LV, no ambiente doméstico (QUINNEL; COURTENAY, 2009; LAINSON, 2010; MAIA; CAMPINO, 2011). O gato doméstico (*Felis catus*) apesar do seu papel inconclusivo na epidemiologia das leishmanioses, tem sido frequentemente diagnosticado infectado por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* (PASSOS et al., 1996; SCHUBACH et al., 2004; DUARTE et al., 2010) e *L. (L.) infantum* (PENNISI, 2002; SAVANI et al., 2004, SOLANO-GALLEGO et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2011; BENASSI et al., 2017). Casos de equinos (*Equus caballus*) infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* também são descritos (KOEHLER et al., 2002; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; ROLÃO et al., 2005; VEDOVELLO-FILHO et al., 2008; SOARES et al., 2013; BENASSI et al., 2018), com a espécie sendo incriminada com possível reservatório primário de LT no ambiente peridoméstico (TRUPPEL, et al., 2014).

Com relação as espécies de mamíferos selvagens, apesar de grande variedade de relatos de infecção por *Leishmania* spp. em várias espécies, há poucos estudos mais aprofundados sobre o papel desses animais na epidemiologia da doença, fazendo com que termos como "hospedeiro" e "reservatório" sejam geralmente tratados como sinônimos (OMS, 1990; ASHFORD, 1996; TRAVI et al., 2002; RAYMOND et al., 2003; ROQUE; JANSEN, 2014). Essa escassez de estudos sobre essas populações, se dá pela óbvia complexidade no acompanhamento da infecção a longo prazo nesses animais, além da dificuldade de se manter essas espécies em cativeiro para infecção experimental (ROQUE; JANSEN, 2014). Contudo, em uma ampla revisão bibliográfica sobre reservatórios selvagens e sinantrópicos de *Leishmania* spp. nas Américas, Roque e Jansen (2014) trazem uma extensa relação de mamíferos, classificadas por eles como "hospedeiros" ou "potenciais reservatórios" do parasita. Com um enfoque no Brasil, o Quadro 2 apresenta as espécies de mamíferos selvagens e sinantrópicos incriminadas como potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. no país, adaptada de Roque e Jansen (2014).

Quadro 2 – Espécies de mamíferos selvagens e sinantrópicos incriminados como potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. no Brasil

ORDEM	ESPÉCIE DE MAMÍFERO	ESPÉCIE DE <i>Leishmania</i> spp.	REFERÊNCIAS
Carnivora	<i>Agouti paca</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	SILVEIRA et al., 1991b
	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	DEANE; DEANE, 1955a; COURTENAY et al., 1996
	<i>Nasua nasua</i>	<i>L. (V.) shawi</i>	LAINSON, 2010
	<i>Speothos venaticus</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	FIGUEIREDO et al., 2008; LIMA et al., 2009
Cingulata	<i>Dasybus novemcinctus</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>	LAINSON; SHAW, 1989; NAIFF et al., 1991
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996
	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	ARIAS et al., 1981; DEDET et al., 1989
Pilosa	<i>Bradypus tridactylus</i>	<i>L. (V.) shawi</i>	LAINSON, 2010
	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) shawi</i>	GENTILE et al., 1981; LAINSON et al., 1981
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	LAINSON et al., 1981
Primata	<i>Cebus apella</i>	<i>L. (V.) shawi</i>	LAINSON et al., 1989
	<i>Chiropotes satanas</i>	<i>L. (V.) shawi</i>	LAINSON et al., 1989
Rodentia	<i>Necomys lasiurus</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	BRANDÃO-FILHO et al., 2003; FREITAS et al., 2012
	<i>Oryzomys spp.</i>	<i>L. (L.) amazonenses</i>	LAINSON, 2010
	<i>Proechimys spp.</i>	<i>L. (L.) amazonenses</i>	ARIAS et al., 1981; DEDET et al., 1989
	<i>Rattus rattus</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	VASCONCELOS et al., 1994; DE LIMA et al., 2002
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	ROQUE et al., 2010

Fonte: Adaptado de Roque e Jansen (2014).

Para a espécie *L. (V.) lindenbergi*, até o 2010, apenas humanos são hospedeiros conhecidos dessa espécie (LAINSON, 2010). Por fim, para Roque e Jansen (2014), apesar do avanço do conhecimento sobre a doença, pouco se conhece sobre a transmissão de *Leishmania* spp. entre os hospedeiros mamíferos e vetores. Conhecimento fundamental para a compreensão da epidemiologia da doença nas diversas regiões que ela ocorre e embasar medidas adequadas de controle (ROQUE, JANSEN, 2014; LOPES et al., 2018).

## 2.2. Flebotomíneos

### 2.2.1. Aspectos gerais

Os flebotomíneos são dípteros taxonomicamente classificados na ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (KILLICK-KENDRICK, 1999) com inúmeros nomes populares a depender do país e/ou região (BASANO; CAMARGO, 2004). São insetos pequenos, geralmente não ultrapassando 3mm comprimento, de coloração castanho claro, corpo intensamente revestido por cerdas, asas lanceoladas, pernas e antenas longas e delgadas e aparelho bucal adaptada para picar e sugar (YOUNG; DUNCAN, 1994; KILLICK-KENDRICK, 1999; BASANO; CAMARGO, 2004; SOUZA, 2017). Os adultos se alimentam de fontes de naturais de açúcar como seiva vegetais e de frutas (SCHLEIN; WARBURG, 1986; BRETAS, 2016), contudo as fêmeas se alimentam de sangue para promover a maturação dos ovos após a cópula (KILLICK-KENDRICK, 1999). Em sua maioria, possuem hábitos crepusculares e noturnos, contudo algumas espécies podem apresentar atividade diurna (KILLICK-KENDRICK, 1999). Pelo hábito de se alimentar de sangue de diversos hospedeiros vertebrados, são importantes vetores de doenças em humanos e animais (BARATA et al., 2005; LATROFA et al., 2011).

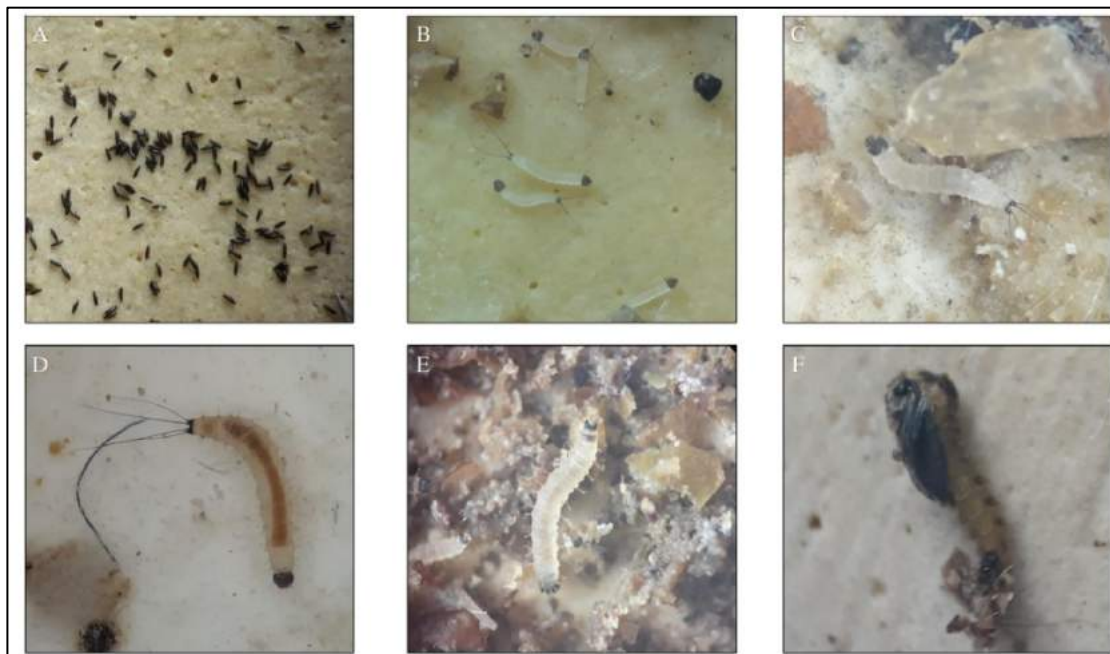
Até o momento, cerca de 1.000 espécies de flebotomíneos foram descritas em todo o Mundo com 530 ocorrendo nas Américas (SHIMABUKURO et al., 2017). Dessas, 98 espécies são vetores confirmados ou suspeitos na transmissão de vírus (*Phlebovirus*, *Vesiculovirus* e *Orbivirus*), bactérias (*Bartonella bacilliformis*) e principalmente protozoários do gênero *Leishmania* spp. (DEPAQUIT et al., 2010; MAROLI et al., 2013; MORICONI et al., 2017).

### 2.2.2. Biologia de flebotomíneos

São insetos holometábolos (apresentam metamorfose completa, em ovo, larva, pupa e adulto) (Figura 4) (KILLICK-KENDRICK, 1999). O acasalamento ocorre no próprio hospedeiro ou em troncos de grandes árvores (MEMMOTT, 1991; 1992). O ciclo total é relativamente longo, ocorrendo entre 30 e 45 dias (ALEXANDER, 2000). Contudo, considera-se que períodos precisos para o desenvolvimento de cada fase é difícil de ser determinado, uma vez que esse tempo é significativamente afetado pela temperatura do ambiente, onde temperaturas baixas prolongam o ciclo, e altas temperaturas encurtando os tempos (KILLICK-KENDRICK, 1999). Contudo, cerca de

4 a 8 dias (em laboratório), após a ingestão do sangue, ocorre a maturação dos ovos no abdômen da fêmea (KILLICK-KENDRICK, 1999). Esse tempo depende da espécie de flebotomíneo, da velocidade da digestão e da temperatura do ambiente (KILLICK-KENDRICK, 1999). As fêmeas ovipõem em locais úmidos, ao abrigo de luz e ricos em matéria orgânica, como por exemplo, entre raízes expostas, sob folhas, pedras e entulhos, em fissuras de rochas, em covas de animais e/ou em abrigos de animais domésticos (principalmente, galinheiros) (FORATTINI, 1973; ALEXANDER, 2000; CASANOVA et al., 2013). Os ovos possuem forma elipsoide de coloração clara logo após a postura, tornando-se escuros tempo depois (Figura 4A) (FIGUEIREDO, 2016) e em condições ambientais favoráveis, eclodem dentre 7 e 10 dias após a postura (KILLICK-KENDRICK, 1999). Seguindo um desenvolvimento larval, relativamente mais lento, que em geral leva ao menos 21 dias (KILLICK-KENDRICK, 1999). As larvas possuem aspecto vermiforme com coloração branca divididos em cabeça, 3 segmentos torácicos com cerdas e 9 abdominais (Figura 4B-E) (FIGUEIREDO, 2016) e se alimentam da matéria orgânica em decomposição (ALEXANDER, 2000). Além disso, apresenta quatro estádios larvais, o primeiro estágio é caracterizado por um par de cerdas caudais, enquanto que os demais, possui dois pares (Figura 4B-E) (FIGUEIREDO, 2016). O quarto e último estágio larval apresenta, ainda, uma mancha escura no último segmento antes de empupar (Figura 4E-F) (FIGUEIREDO, 2016). A fase de pupa tem duração de aproximadamente 10 dias até a emergência dos adultos, interessante os machos tendem a emergir antes das fêmeas (KILLICK-KENDRICK, 1999). Os adultos são alados e apresentam grande dimorfismo sexual, representados nos últimos segmentos abdominais (genitália) e na probóscide (aparelho bucal picador desenvolvido nas fêmeas) (Figura 5) (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento de formas imaturas de *Lu. (Lu.) longipalpis*: (A) ovos; (B) larva de 1º estágio (L1), (C) larva de 2º estágio (L2), (D) larva de 3º estágio (L3), (E) larva de 4º estágio (L4) e (F) pupa



Fonte: Silva (2019).

Figura 5 – Adultos de *Lu. (Lu.) longipalpis* machos (A) e fêmeas (B) capturados nesse trabalho



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os insetos adultos são frequentemente encontrados em troncos de árvores, vegetação densa, fissuras em rochas ou solo, sob folhas caídas, tocas de animais, ninhos de pássaros, cavernas e cupinzeiros (KILLICK-KENDRICK, 1999; GALATI et al., 2003). Também sendo frequentemente encontradas no ambiente peridoméstico como os abrigos de animais domésticos (currais, galinheiros e chiqueiros), fendas de paredes e

latrinas (KILLICK-KENDRICK, 1999; GUIMARÃES E SILVA, 2016). Geralmente, os adultos, tendem a não se afastar do local de reprodução, embora possam ser capturados até 1km do ponto em que foram liberados, a maioria possui um raio de voo de até 250m (MORRISON et al., 1993).

### 2.2.3. Sistemática de Phlebotominae

O primeiro flebotomíneo descrito foi o *Bibio papatasi* por Scopoli em 1786, na região da Lombardia, norte da Itália (SCOPOLI 1786; GRASSI 1907). Cerca de 50 anos depois, Rondani (1840) propuseram o gênero *Phlebotomus*. Com o passar do tempo a taxonomia de flebotomíneos evoluiu rapidamente, principalmente pela sua importância com vetores de *Leishmania* spp. (GALATI, 2018). Contudo a evolução da taxonomia de flebotomíneos americanos foi mais lenta (SHIMABUKURO; GALATI, 2011). Entretanto até 1948, todos os flebotomíneos eram descritos dentro do gênero *Phlebotomus*, quando na época, Theodor propõem a primeira divisão em quatro gêneros: *Brumptomyia* (França & Parrot, 1921) e *Lutzomyia* (França 1924) (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840) e *Sergentomyia* (França & Parrot, 1920) (no Velho Mundo) (THEODOR, 1948; SHIMABUKURO et al., 2011). Ainda o gênero *Warileya* (Hertig 1948) (Novo Mundo) é incluído por Lewis et al (1977). Atualmente, permanece essa sistemática que divide esta subfamília em cinco gêneros (SHIMABUKURO et al., 2011).

Chaves taxonômicas são importantes para a correta identificação dos organismos sendo, em geral, baseada em caracteres morfológicos (SHIMABUKURO et al., 2011; SILVA, 2016), assim atualmente duas classificações vêm sendo utilizadas por pesquisadores em todo o mundo: a sistemática proposta por Young e Duncan (1994) e a por Galati (1995; 2003ab) que é atualizada anualmente (SILVA, 2016). A proposta de Young e Duncan (1994) possui uma abordagem mais conservadora baseada em critérios simples e práticos, com o gênero *Lutzomyia* subdividido em 15 subgêneros e 11 grupos (SILVA, 2016). Já a sistemática de Galati (1995; 2003ab) tem uma abordagem filogenética, o que leva a uma inferência evolutiva mais substancial entre os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, que foi então, reclassificado pela autora em 18 gêneros, ao invés de um único (GALATI, 2003ab; SHIMABUKURO; GALATI, 2011; SILVA, 2016). Assim, a proposta de cladística elaborada por Galati (1995; 2003ab) para classificar os flebotomíneos das Américas (SHIMABUKURO et al., 2011) foi adotada nesse estudo. Essa classificação, consistiu de um extenso estudo morfológico de

diversos caracteres incluindo, principalmente, estruturas relacionadas aos apêndices dos insetos (SHIMABUKURO et al., 2011). Dessa forma, a autora propõe a reclassificação da tribo IDIOPHLEBOTOMINI (Artemiev, 1991) [sinonímia = HERTIGIINI (Abonnenc & Lèger, 1976)] e a manutenção da tribo PHLEBOTOMINI (Rondani 1840). Propõe ainda, o uso de quatro subtribos BRUMPTOMYIINA (Artemiev 1991), PSYCHODOPYGINA (Galati 1995), SERGENTOMYIINA (Artemiev 1991) e LUTZOMYIINA (Abonnenc & Lèger 1976) (SHIMABUKURO et al., 2011). Baseado nessa classificação, os flebotomíneos do Novo Mundo foram reclassificados em 22 gêneros (GALATI, 1995; 2003ab; SHIMABUKURO et al., 2011).

#### 2.2.4. Estudos de fauna de flebotomíneos

Como mencionado anteriormente, no Brasil, o perfil epidemiológico da LT e LV vem mudando nos últimos anos, muito em virtude das ações antrópicas no ambiente (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014). A pressão ambiental em certas regiões, tem impactado significativamente a fauna de flebotomíneos, fazendo com que certas espécies potencialmente vetoras frequentem o peridomicílio e o intradomicílio (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; DIAS et al., 2007) que muitas vezes oferecem condição favorável à reprodução e alimentação dessas espécies (TEODORO et al., 1993; DIAS et al., 2007). Em trabalho de Mayo et al. (1998) e Michalsky et al. (2009), *Ny. whitmani* (vetor de LT) e *Lu. (Lu.) longipalpis* (vetor de LV) foram dominantes no ambiente domiciliar. Além disso, algumas espécies de flebotomíneos possuem alta capacidade de se adaptarem a novos ambientes modificados por seres humanos (XIMENES et al., 2007). Dessa forma, populações humanas que residem em regiões periurbanas e rurais de áreas endêmicas, são altamente expostas a picada desses dípteros (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994), refletido nas altas taxas de humanos soropositivos saudáveis, no teste intradérmico de Montenegro (MARZOCHI et al., 1980).

Os estudos sobre a fauna de flebotomíneos são fundamentais e no Brasil, diversos trabalhos vem sendo realizados, tentando elucidar características de distribuição geográfica, sazonalidade e bioecologia dessa família, mas em algumas regiões do país, pouco se sabe sobre a fauna desses insetos (ANDRADE FILHO et al., 2001; SARAIVA et al., 2006). Das 530 espécies das Américas, 265 são descritas no Brasil, país que possui maior biodiversidade de espécies de flebotomíneos no continente americano (SHIMABUKURO et al., 2017; GALATI, 2018). No estado de São Paulo, 69 espécies de flebotomíneos de 14 gêneros já foram registradas em 210 (32%) dos 645



municípios (GALATI, 2003; SHIMABUKURO; GALATI, 2011). O estado apresenta três espécies vetores de LT, são elas: *Ny. intermedia* (em 13 municípios), *Ny. whitmani* (em 105 municípios), *Mg. (Mig.) migonei* (em 93 municípios) e *Bi. flaviscutellata* (SHIMABUKURO; GALATI, 2011; GALATI, 2018). Além de outras três incriminadas como vetores suspeitos: *Ny. neivai* (em 40 municípios), *Pi. (Pin.) fischeri* (em 121 municípios), *Pi. (Pin.) pessoai* (em 69 municípios) e *Ps. ayrozai* (SHIMABUKURO; GALATI, 2011; GALATI, 2018). O estado, também, registra em 29 municípios a principal espécie vetor de LV, *Lu. (Lu.) longipalpis* (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

#### 2.2.5. Estudos de sazonalidade de flebotomíneos

Estudo sobre a sazonalidade de flebotomíneos tentam entender aspectos climáticos que favorecem a biologia desses insetos e as suas implicações na epidemiologia das leishmanioses em uma área (SARAIVA, et al. 2006). Assim, esse tipo de estudo é fundamental, não apenas para os biólogos, mas também para os epidemiologistas (AGUIAR; SOUCASAUX, 1984). A partir deles, se sabe que fatores climáticos como temperatura, pluviosidade e umidade relativa, podem estar relacionadas a fauna de flebotomíneos em algumas áreas (MISCEVIC, 1981; ROBERTS, 1994; SCORZA et al., 1968). No Brasil, Barreto (1943) foi o primeiro a observar a sazonalidade de flebotomíneos (AGUIAR; SOUCASAUX, 1984). Em seu trabalho, a captura desses insetos foi menor no meses frios e secos do ano (BARRETO, 1943), confirmado por outros trabalhos que o sucederam (COUTINHO; BARRETO, 1941; DEANE; DEANE, 1955b; SHAW; LAINSON, 1972; GOMES; GALATI, 1977; AGUIAR; SOUCASAUX, 1984). De modo geral, os habitats naturais de reprodução dos flebotomíneos possuem uma temperatura e umidade ótimas, e pequenas variações nesses fatores levam a um prejuízo dessas populações (DIAS et al., 2007). A chuva, quando em quantidades adequadas parece ser um fator determinante para modificar as condições dos criadouros, beneficiando ou prejudicando (quando em excesso) a reprodução desses insetos (RUTLEDGE; ELLENWOOD, 1975).

Apesar de se observar uma alta ocorrência desses insetos nos meses mais quentes e úmidos do ano (AGUIAR; SOUCASAUX, 1984), nem sempre essa lógica é observada (CONDINO et al., 1998; DIAS et al., 2007). Segundo Forattini (1954) há espécies mais resistentes a variação climática, assim, algumas continuam a ser encontradas, geralmente, em menor quantidade, nos meses frios e secos (AGUIAR;

SOUKASAUX, 1984). Trabalhos semelhantes verificaram que apenas a umidade e a pluviosidade impactaram significativamente a densidade de flebotomíneos (BARATA et al., 2004; MACEDO et al., 2008). Por sua vez, Saraiva et al. (2006) encontrou picos na quantidade de insetos nos meses quentes e úmidos e meses secos e quentes, tendo apenas a temperatura sido correlacionado com a densidade desses insetos. A temperatura e umidade relativa impactaram a densidade de flebotomos em trabalho de Almeida et al. (2010), que também observou, apesar de não significativo, picos de capturas após as chuvas. Segundo, Teodoro et al. (1993) e Saraiva et al. (2006), as alterações causadas pela presença humana, como a manutenção de animais (fonte alimentar) e aumento de lixo doméstico (nicho reprodutivo) podem influenciar a densidade de flebotomíneos em uma área, tendo um papel tão importante quanto o clima da região em estudo.

Os estudos sobre a sazonalidade de flebotomíneos, tem contribuído com dados sobre riscos de transmissão de *Leishmania* spp. em uma região (MARCONDES et al., 2001). A grande dificuldade desses estudos, reside no fato de necessitar de um acompanhamento longo dessas populações. Dados de sazonalidade confiáveis só podem ser obtidos em investigações com mais de 2 anos consecutivos, diminuído assim, as margens de erros por anos atípicos (DIAS et al., 2007). Entretanto, esses trabalhos, se fazem extremamente fundamentais para o entendimento da epidemiologia das doenças transmitidas por esses vetores, em especial as leishmanioses, predizendo ações de controle desses insetos em momentos mais adequados (SARAIVA et al., 2006).

#### 2.2.6. Estudos de infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Estudos epidemiológicos que determinam a presença de *Leishmania* spp. em flebotomíneos são fundamentais para o entendimento da competência vetorial e epidemiologia das leishmanioses, ajudando a elucidar os padrões de transmissão em uma área (ARANSAY et al., 2000; MICHALSKY et al., 2002; PERRUOLO et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2017). Para Rossi et al. (2008) esses estudos são importantes indicadores sobre a intensidade da transmissão do parasita. Dessa forma, esses estudos têm sido amplamente realizados, seja através da visualização direta, em microscópio óptico, do parasita no trato digestivo do vetor, técnica laboriosa e de baixa sensibilidade (BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011), ou através de técnicas moleculares que permitem a identificação do DNA de *Leishmania* spp. Essas últimas, amplamente

empregadas, pois apresentam alta sensibilidade e especificidade mesmo em situações de baixa quantidade de parasita no trato digestivo do vetor (DE BRUIJN; BARKER, 1992; PEREZ et al., 1994; PITA-PEREIRA et al., 2005; SARAIVA et al., 2010). Assim, várias técnicas já foram empregadas como a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) (SILVA et al., 2008), PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (SARAIVA et al., 2010), PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011; CUNHA et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2017). Direcionados à uma variedade de genes, como região do DNA do Kinetoplasto do parasito (kDNA) (MICHALSKY et al., 2002; CUNHA et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2017), internal transcribed spacer 1 e 2 (ITS-1, ITS-2) (JIMÉNEZ et al., 2013; ÁVILA et al., 2018) e a subunidade 18S do DNA ribossomal (rDNA) (BEZERRA-VASCONCELOS et al., 2011).

#### 2.2.7. Estudos de identificação de hábitos alimentares de flebotomíneos

Em consonância com os estudos de infecção natural por *Leishmania* spp., as investigações sobre os hábitos alimentares dos flebotomíneos possuem grande valor epidemiológico, uma vez que permitem identificar hospedeiros que sofrem frequentemente, o repasto sanguíneo dos flebótomos e podem indicar potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. em uma região (BARATA et al., 2005; HAOUAS et al., 2007; QUARESMA et al., 2012). Nesse contexto, estudos sobre o conteúdo estomacal desses dípteros vêm sendo realizados a partir de métodos sorológicos, como o teste da precipitina e o ensaio de imunoabsorbância ligada a enzima (ELISA) (DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2005; MARASSÁ, et al., 2013), e métodos moleculares (cPCR, qPCR e PCR-RFLP) (SANT'ANNA et al., 2008; SOARES et al., 2014; BAUM et al., 2015; SALES et al., 2015; CARVALHO et al., 2017). Para Haouas et al. (2007) as técnicas sorológicas tornaram-se ultrapassadas, principalmente pela baixa sensibilidade e especificidade e a necessidade de produção de anticorpos específicos para cada fonte de repasto a ser identificada, com consequente incapacidade de antever reservatórios não esperados.

Tais desvantagens impulsionaram o uso das técnicas moleculares nesses estudos, que estão em sua maioria, direcionados ao gene nuclear, prepronociceptina (PNOC) (BAUM et al., 2015), e aos mitocondriais como o citocromo B (CYT-B) e a subunidade I do citocromo C oxidase (SANT'ANNA et al., 2008; KENT et al., 2009; SOARES et

al., 2014; SALES et al., 2015; CARVALHO et al., 2017). Contudo, muitos estudos têm demonstrado que a utilização desses últimos, apresenta maiores vantagens, como a utilização do CYT-B que por ter localização genômica mitocondrial permanecem mais conservados e apresentam maior disponibilidade de sequências estudadas e depositadas em bancos de dados, como o Genbank® (PERKINS; SCHALL, 2002). Dessa forma, baseados nesse gene, Soares et al. (2014), através da PCR-RFLP, identificaram fêmeas de flebotomíneos alimentadas com sangue de humanos, equinos e bovinos. Já Sant’Anna et al. (2008), identificaram apenas repasto de sangue desses insetos em galinhas na PCR multiplex do mesmo gene. Em outro trabalho, Carvalho et al. (2017), reportaram repasto em humanos, cães, galinhas e roedor. Sales et al. (2015) identificaram como fonte alimentar, a galinha, o homem, cão, cavalo, rato e gato por qPCR. Ainda que ora similares, ora divergentes, esses resultados demonstram o oportunismo desses insetos, sendo capazes de se alimentar em uma ampla variedade de vertebrados (DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar os aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para LT e LV no estado de São Paulo, Brasil.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Coletar e identificar, a nível de espécie, flebotomíneos machos e fêmeas em área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo.
- Identificar padrões de sazonalidade de flebotomíneos.
- Analisar os métodos de extração de DNA em amostras individuais de fêmeas de flebotomíneos.
- Detectar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos.
- Identificar as fontes de repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos.

#### 4. ARTIGO 1

1 ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:  
2 PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA ENDÊMICA DE  
3 LEISHMANIOSES: SAZONALIDADE, DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania*  
4 spp. E HÁBITOS ALIMENTARES

5 João Augusto Franco Leonel<sup>1,2</sup>, Geovanna Vioti<sup>1,2</sup>, Maria Luana Alves<sup>1,2</sup>, Júlio César  
6 Pereira Spada<sup>1,2</sup>, Alex Kazuo Yamaguchi<sup>1</sup>, Nuno Wolfgang Balbini Pereira<sup>1,2</sup>, Diogo  
7 Tiago da Silva<sup>1,2</sup>, Julia Cristina Benassi<sup>1</sup>, Fredy Galvis-Ovallos<sup>3</sup>, Eunice Aparecida  
8 Bianchi Galati<sup>3</sup>, Wilma Aparecida Starke-Buzetti<sup>4</sup>, Rodrigo Martins Soares<sup>2,5</sup>, Trícia  
9 Maria Ferreira de Sousa Oliveira<sup>1,2\*</sup>

10

11 <sup>1</sup>Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada, Departamento de Medicina  
12 Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São  
13 Paulo – USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

14

15 <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses,  
16 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de  
17 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga,  
18 São Paulo, Brasil.

19

20 <sup>3</sup>Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública,  
21 Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.

22

23 <sup>4</sup>Departamento de Biologia e Zootecnia, Faculdade de Engenharia, Universidade  
24 Estadual de São Paulo – UNESP, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

25

26 <sup>5</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de  
27 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga,  
28 São Paulo, Brasil.

29

30 **\*Autor correspondente:**

31 E-mail: tricia@usp.br (TMFSO)

32

## 33 **Resumo**

34 Atualmente, temos observado mudanças importantes nos padrões de transmissão  
35 da leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV) em áreas endêmicas do Brasil. Além  
36 disso, a LV avança rapidamente para novas áreas, que no passado eram consideradas  
37 indenes. Os estudos sobre flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são  
38 fundamentais para a melhor compreensão da complexa epidemiologia da doença,  
39 revelando os aspectos biológicos desses vetores e suas relações com o parasita e seus  
40 reservatórios. Dessa forma, realizamos um estudo sobre os aspectos bioecológicos de  
41 flebotomíneos em uma área endêmica de LT e LV no Brasil. Foi realizado um  
42 levantamento entomológico para descrever a fauna, sazonalidade, taxa de PCR positivo  
43 para o DNA de *Leishmania* spp. e as fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos na  
44 área de estudo. Em nosso trabalho, foram encontradas doze espécies de flebotomíneos,  
45 entre vetores comprovados ou suspeitos nos ciclos epidemiológicos da LT e LV.  
46 Padrões sazonais entre fatores climáticos estudados (temperatura, umidade relativa do ar  
47 e precipitação) e a fauna desses insetos, capturados com armadilhas luminosas do tipo  
48 CDC, não foram observados. Encontramos o kDNA de *Leishmania* spp. em uma fêmea  
49 não ingurgitada de *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi*. A identificação das fontes  
50 alimentares de sangue mostrou suínos, humanos, cães, bovinos, galinhas e gambás  
51 como hospedeiros vertebrados de flebotomíneos na área de estudo. Os resultados e as  
52 implicações de nossas descobertas são discutidos abaixo.

## 53 **Resumo do autor**

54 As leishmanioses são importantes doenças tropicais negligenciadas, presentes  
55 principalmente em países pobres do mundo. A leishmaniose tegumentar (TL) e a  
56 visceral (LV) são as principais formas clínicas da doença em humanos e são causadas

57 por protozoários do gênero *Leishmania*. A picada de fêmeas de flebotomíneos é a  
58 principal forma de transmissão nas cadeias epidemiológicas da LT e LV. Os estudos  
59 sobre esses insetos são fundamentais para a melhor compreensão da complexa  
60 epidemiologia da doença, e assim, prever medidas de controle mais assertivas em uma  
61 área. Neste trabalho, os aspectos bioecológicos da fauna de flebotomíneos foram  
62 estudados em uma área, no Brasil, onde LT e LV ocorrem comumente entre humanos e  
63 animais. Vetores comprovados e suspeitos foram encontrados na área de estudo. Além  
64 disso, o kDNA de *Leishmania* spp. foi encontrado em uma espécie de flebotomíneo não  
65 vetora. Na área de estudo, seis espécies de vertebrados (suínos, humanos, cães, bovinos,  
66 galinhas e gambás) foram comprovadamente fontes alimentares de sangue para  
67 flebotomíneos. Nossos resultados trazem novas informações sobre a bioecologia de  
68 flebotomíneos em uma área endêmica de LT e LV do Novo Mundo.

## 69 **Introdução**

70 As leishmanioses são importantes doenças transmitidas por vetores causadas por  
71 parasitas do gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) endêmicas em  
72 102 países e territórios do mundo [1,2] e, desde suas descrições iniciais, tornaram-se o  
73 foco de pesquisas em vários países. São doenças tropicais negligenciadas, fortemente  
74 ligada à pobreza, que afetam principalmente populações pobres nos países em  
75 desenvolvimento, onde possuem grande importância em saúde pública e veterinária [3–  
76 5].

77 Nas Américas, apesar da contínua redução no número de casos humanos de LT  
78 [6], a doença continua sendo um grave problema de saúde pública, com um número  
79 significativo de pessoas infectadas no continente, sendo o Brasil, responsável pelo  
80 maior número de casos [6]. Em relação aos casos humanos de LV, o número tem se  
81 mantido estável nos últimos anos, no entanto, houve uma expansão geográfica associada

82 a um aumento na taxa de mortalidade da doença nas Américas, especialmente em países  
83 como Argentina, Brasil, Paraguai [6]. Em 1980, o Brasil implementou os programas de  
84 vigilância e controle de LT e LV no território nacional [7,8]. No entanto, as estratégias  
85 de controle adotadas não vêm sendo eficazes para reduzir o número de novos casos ou  
86 conter a disseminação da doença [9]. A dificuldade do controle da LT no Brasil está  
87 relacionada à diversidade de agentes etiológicos, reservatórios e vetores, além de  
88 diferentes padrões de transmissão que a doença apresenta no país [7]. Por sua vez, a  
89 ineficiência do controle da LV pode ser explicada pela dificuldade no diagnóstico de  
90 reservatórios assintomáticos, a possibilidade de outras formas de transmissão ou a  
91 presença de outros reservatórios da doença [10]. Esses fatos podem explicar a  
92 disseminação e urbanização das leishmanioses no país.

93 Denominados de "mosquito-palha" devido ao corpo de coloração amarela pálida  
94 ou arenosa [11], os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são os  
95 principais vetores de leishmanioses, tendo papel central na manutenção da infecção por  
96 parasitas *Leishmania* spp. [10]. Atualmente, 1.000 espécies de flebotomíneos foram  
97 descritas em todo o mundo, das quais 530 estão presentes nas Américas [12].

98 Com cerca de 3 mm de comprimento corporal, esses pequenos e hirsutos insetos  
99 possuem grande relevância médica e veterinária [13,14]. Embora, machos e fêmeas de  
100 flebotomíneos se alimentem de fontes naturais de açúcar [13,15], apenas as fêmeas  
101 precisam se alimentar de sangue para prover a nutrição e maturação dos ovos [13]. As  
102 fêmeas de flebotomíneos são consideradas oportunistas, podendo se alimentar de sangue  
103 de uma grande variedade de hospedeiros, dessa foram, atuam como vetores de  
104 importantes patógenos para humanos e animais [16,17]. Cerca de 98 espécies de  
105 flebotomíneos são confirmadas ou suspeitas de serem vetoras de *Leishmania* spp.,  
106 Phlebovírus, Vesiculovírus, Orbivírus e *Bartonella bacilliformis* [11,18].



107 O conhecimento da epidemiologia da LT e LV ainda não está claro em alguns  
108 aspectos [7,19]. Apesar do significativo avanço do nosso conhecimento sobre a doença,  
109 pouco se sabe sobre as interações entre os flebotomíneos, parasitas e hospedeiros  
110 mamíferos [20]. A adoção de medidas de controle eficientes depende do amplo  
111 conhecimento de todos os parâmetros dinâmicos da infecção entre os vários  
112 participantes da cadeia epidemiológica da doença [9].

113 Nesse sentido, os estudos sobre a biologia dos flebotomíneos e suas relações  
114 entre hospedeiros vertebrados e patógenos constituem uma importante ferramenta  
115 epidemiológica [16,21,22]. A identificação de fontes de repasto sanguíneo e a taxa de  
116 flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas, fornecem importantes  
117 informações epidemiológicas [22,23]. Essas investigações podem apontar um potencial  
118 vetor ou hospedeiro vertebrado reservatório e ajudar a elucidar o ciclo natural de  
119 transmissão em uma área, para dessa forma, liderar a adoção de medidas de controle  
120 mais eficientes [13,16,21–26]. Nesse trabalho, investigamos a fauna de flebotomíneos e  
121 seus aspectos biológicos, como sazonalidade, taxa de PCR positiva para o DNA de  
122 *Leishmania* spp. e os hábitos alimentares de flebotomíneos em área endêmica para LT e  
123 LV no estado de São Paulo, Brasil.

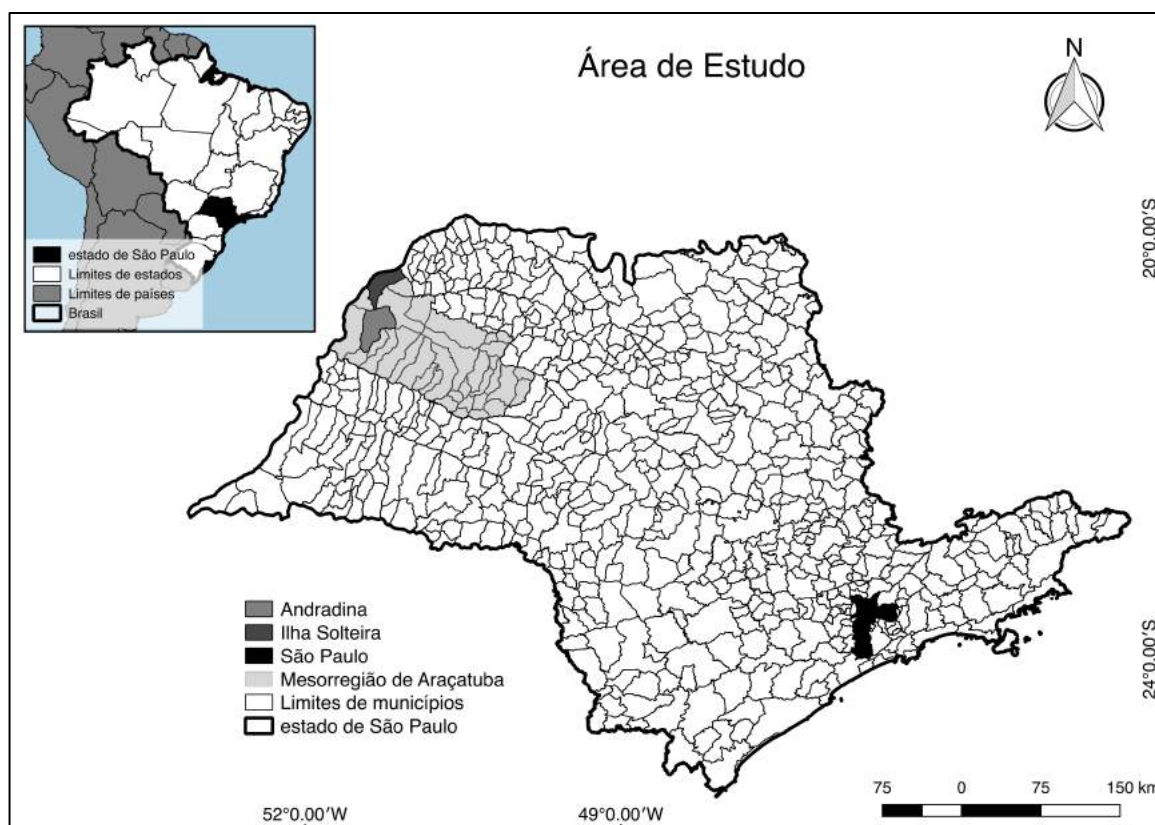
## 124 **Métodos**

### 125 **Área de estudo**

126 As cidades de Andradina e Ilha Solteira estão localizadas na mesorregião  
127 administrativa de Araçatuba, estado de São Paulo, a cerca de 650 km da cidade de São  
128 Paulo, capital do estado (Fig. 1). Segundo a classificação de Köppen para ambas as  
129 cidades, o clima é do tipo 'Aw', tropical úmido com estação seca, e está associado ao  
130 bioma do Cerrado [27,28]. Em Andradina, nos últimos 10 anos, 13 e 50 casos humanos

131 de LT e LV foram relatados, respectivamente [29,30]. Por outro lado, Ilha Solteira  
 132 registrou, no mesmo período, 3 e 10 casos humanos de LT e LV, respectivamente  
 133 [29,30].

134 **Fig 1. Localização das cidades de Andradina e Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.**



135  
 136 Fonte: Mapa elaborado pelo autor, utilizando o software QGIS 2.18 “Las Palmas” [76] com *shapefiles* de  
 137 livre acesso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [77].

### 138 **Capturas de flebotomíneos**

139 Entre janeiro de 2018 e junho de 2019, foram realizadas capturas sistematizadas  
 140 de flebotomíneos em sete pontos distintos para cada cidade da área em estudo (Figura  
 141 1). A cada mês, durante três noites consecutivas, uma armadilha luminosa do tipo CDC  
 142 foi instalada no peridomicílio, próximo a abrigos de animais ou vegetação, entre 10 e  
 143 20m da residência [31]. As armadilhas foram montadas a cerca de um metro do chão,  
 144 entre as 17:00 e as 7:00 h, sem respeitar o horário de verão [31].

145 Capturas não sistematizadas também foram realizadas com armadilhas  
146 luminosas do CDC nos mesmos pontos de cada cidade. Novamente, uma ou duas  
147 armadilhas foram colocadas entre uma e cinco noites consecutivas por mês, instaladas  
148 como descrito acima.

#### 149 **Identificação de espécies**

150 Os insetos capturados foram rapidamente transportados ao laboratório em uma  
151 caixa de isopor com gelo reciclável. Em seguida, foram eutanasiados em freezer a -20  
152 °C por 20 minutos e examinados. O número de flebotomíneos capturados foi registrado  
153 de acordo com o sexo, local e data da captura. Machos e fêmeas (cabeça e terminália)  
154 foram preservados individualmente em microtubos estéreis com álcool 70%. Em  
155 seguida, os insetos foram submetidos a bateria de clarificação e montados em lâminas  
156 de vidro [32] para identificação de espécies conforme Galati et al. [33], com abreviação  
157 de gêneros de acordo com Marcondes et al. [34]. Além disso, o tórax e o abdômen das  
158 fêmeas foram preservados individualmente em tubos estéreis com álcool absoluto  
159 (Merck) a -20 °C até o momento da extração do DNA e análises moleculares. Os  
160 instrumentos utilizados na etapa de triagem e corte dos insetos, bem como as áreas de  
161 trabalho foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 2%.

#### 162 **Análises moleculares**

163 **Extração de DNA.** A extração do DNA do tórax e abdômen de cada fêmea, foi  
164 realizada de acordo com Bruford et al. [35], com modificações de Galvis-Ovallos et al.  
165 [31]. Para evitar a contaminação de DNA entre as amostras, todo o procedimento foi  
166 realizado em cabine de segurança biológica (ESCO). Os instrumentos e a cabine foram  
167 desinfetados como descrito acima, seguido por 15 minutos sob incidência de luz  
168 ultravioleta (UV). Além disso, foram utilizados machos *de Lutzomyia (Lutzomyia)*

169 *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) da colônia do Laboratório de Entomologia em Saúde  
170 Pública / Phlebotominae (LESP), da Faculdade de Saúde Pública (FSP), da  
171 Universidade de São Paulo (USP), como controles negativos internos em todas as  
172 extrações de DNA [36].

173       **PCR convencional.** O DNA extraído do tórax e abdômen de cada flebotomíneo  
174 fêmea foi submetido à PCRs convencionais descritas na Tabela 1. Para avaliar a  
175 qualidade da extração de DNA, foi realizada uma PCR para amplificação da região  
176 IVS6 do gene da cacofonia de flebotomíneos (controle endógeno), com os iniciadores  
177 descritos por Lins et al. [37] e protocolo de acordo com Pita-Pereira et al. [38] com  
178 modificações (Tabela 1). A detecção do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada através  
179 da PCR para o DNA circular do Kinetoplasto (kDNA) do parasita, como descrito por  
180 Rodgers et al. [39] (Tabela 1). As amostras positivas na PCR anterior, foram ainda,  
181 submetidas a amplificação das regiões Internal Transcribed Spacer 1 e 2 (ITS-1; ITS-2),  
182 de acordo com El Tai et al. [40] (Tabela 1). Uma PCR para identificação das fontes  
183 alimentares de sangue foi realizada através do gene citocromo B (CYT-B), de acordo  
184 com Steuber et al. [41], apenas em amostras de DNA de tórax e abdômen de fêmeas  
185 ingurgitadas, parcialmente ingurgitadas ou grávidas (Tabela 1).

Tabela 1. Gene, primer e protocolos usados nas análises moleculares de DNA de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos nesse trabalho.

Gene alvo	Primer	Reagentes	Sequência térmica	Tamanho*	Referências
Cacofonia (IVS6)	5Llac (5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3') 3Llac (5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3') Lins et al. [37]	20mM Tris-HCl; 50mM KCl; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 200µM DNTP's; 0,5µM primer; 1U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2,5µL DNA	94°C 12 min, 35 ciclos (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s), 72°C 10 min	220pb	Pita-Pereira et al. [38] com modificações
Citocromo B (CYT-B)	CYT-B1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') CYT-B2 (5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3')	10mM Tris-HCl; 50mM KCl; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> , 100µM DNTP's; 0,5µM primer; 1U Platinum® Taq DNA Polymerase; 2,5µL DNA	95°C 10 min, 35 ciclos (94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 45s), 72°C 5 min	359pb (sequenciamento)	Steuber et al. [41]
kDNA <i>Leishmania</i> <i>spp.</i>	13A (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCAAGTT-3')	200mM Tris-HCl; 500mM KCl; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,31mM DNTP's; 0,26µM primer; 1U Taq Polimerase; 2,5µL DNA	94°C 3 min, 35 ciclos (94°C 40s, 56°C 30s, 72°C 30s), 72°C 5 min	120pb	Rodgers et al. [39]
Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1)	LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') L5.8S (5'-TGATACTTATCGCACTT-3')	50mM Tris-HCl; 10mM KCl; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2mM DNTP's; 0,5µM primer; 2U Taq Polimerase; 2,5µL DNA	95°C 4 min, 35 ciclos (95°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1 min), 72°C 5 min	300/350pb (sequenciamento)	El Tai et al. [40]
Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2)	L5.8SR (5'-AAGTGCATAAGTGGTA-3') LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3')	50mM Tris-HCl; 10mM KCl; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2mM DNTP's; 0,5µM primer; 2U Taq Polimerase; 2,5µL DNA	95°C 4 min, 35 ciclos (95°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1 min), 72°C 5 min	700pb (sequenciamento)	El Tai et al. [40]

Nota: \*em pares de base (pb); Fonte: Elaborado pelo autor.

189 Todas as amplificações foram realizadas em termociclador C1000 Touch™  
190 Thermal Cycler (Bio-Rad) e água deionizada estéril foi usada como controle negativo.  
191 Amostras de DNA extraído de *Lu. (Lu.) longipalpis* da colônia do LESP-FSP/USP  
192 foram utilizadas como controle positivo na PCR de controle endógeno. Enquanto que  
193 DNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/pH8) fornecido pelo  
194 Laboratório de Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro,  
195 foi utilizado como controle positivo na PCR para detecção de DNA de *Leishmania* spp.  
196 Além disso, DNA de cão foi utilizado como controle positivo na PCR de identificação  
197 de fontes de repasto sanguíneo.

198 Doze microlitros dos produtos de PCR foram misturados com 3µl de tampão de  
199 amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol a 0,005% m/v e glicerol a 10%  
200 v/v) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% [40,41] e 2% [37,39] corado  
201 com SYBR® Safe (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE  
202 1x (pH 8,0) (Invitrogen®) a 100V por 45-60min com DNA Ladder RTU® (KASVI) de  
203 100 pares de base (pb). Um transiluminador UV Photo Doc-It® (UVP) foi usado para  
204 visualizar e fotografar os produtos amplificados no gel de agarose.

205 **Sequenciamento.** A PCR positiva para os genes ITS-1, ITS-2 e CYT-B foi  
206 enviada para o sequenciamento de Sanger usando 30ng/µl do produto de PCR  
207 purificado. O software Chromas foi utilizado para verificar manualmente os  
208 eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*. O BioEdit Sequence Alignment  
209 Editor foi usado para alinhar e gerar sequências consenso, que foram confrontadas com  
210 as sequências depositadas na base de dados GenBank através do Basic Local Alignment  
211 Search Tool (BLAST). A identificação das espécies de vertebrados e *Leishmania* spp.  
212 foi considerada correta quando as sequências apresentaram mais de 96% de identidade  
213 com pelo menos 95% da sequência analisada [36].

## 214 **Análise de dados**

215 Para complementar as informações obtidas através da identificação de espécies e  
216 análises moleculares dos flebotomíneos, foram coletadas informações sobre  
217 características ambientais de cada ponto. Assim, foram registrados dados qualitativos da  
218 paisagem e fauna doméstica ou selvagem em um raio de aproximadamente 500m de  
219 cada ponto de captura. Esses dados foram obtidos mensalmente por observação e  
220 conversas com os moradores locais.

221 Para medir a influência de fatores climáticos no número de flebotomíneos  
222 capturados por mês, foram obtidos dados climáticos nos sites das estações  
223 meteorológicas do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do Estado de  
224 São Paulo [42] e da Faculdade de Engenharia, da Universidade Estadual do Estado de  
225 São Paulo (UNESP). Os dados de umidade relativa do ar não estavam disponíveis para a  
226 cidade de Andradina. Assim, consideramos para essa variável os valores referentes à  
227 cidade de Ilha Solteira, a cerca de 40km de Andradina. As correlações de Spearman ( $\rho$ )  
228 e Pearson ( $r$ ) (análise não paramétrica) foram usadas para avaliar a relação entre os  
229 fatores climáticos e a quantidade de flebotomíneos capturados por mês, considerando  
230 apenas as capturas sistematizadas. As análises foram realizadas no software estatístico  
231 R, versão 3.1.1 [43].

## 232 **Resultados**

### 233 **Ecótopos**

234 Neste estudo, quatorze ecótopos (sete para cada cidade) em área urbana ou rural  
235 foram definidos para capturas sistematizadas e não sistematizadas de flebotomíneos. A  
236 fauna e a paisagem em um raio de aproximadamente 500m da armadilha de luz, em  
237 cada ponto, foram registradas. A caracterização de cada ecótopo está apresentada na

238 Tabela 2. Em todos os pontos, animais domésticos estavam presentes (Tabela 2). Em  
239 relação aos animais selvagens, pelo menos uma espécie, das seis ordens de mamíferos  
240 conhecidas como reservatórios de *Leishmania* spp. nas Américas [20], foi observada ou  
241 relatada pelos moradores da área, em algum ponto de captura (Tabela 2). Quanto a  
242 paisagem, variaram entre ambiente urbano, ambiente modificado para agricultura ou  
243 pecuária e fragmentos de florestas nativas (Tabela 2).



14 Tabela 2. Caracterização dos ecótopos onde foram realizadas capturas sistematizadas e não sistematizadas de flebotomíneos nas cidades de Andradina  
 15 e Ilha Solteira, com observações sobre fauna e paisagem presentes em cada um.

<u>ANDRADINA</u>																	
Ecótopos	Área	Descrição	Animais domésticos								Animais silvestres <sup>a</sup>					Paisagem	
			<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Gallus gallus</i>	DIDELPHIMORPHIA	PILOSA	CINGULATA	RODENTIA	CARNIVORA		PRIMATA
AND-1	Urbana	Bosque	-	X	X	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	X	Fragmento de floresta nativa
AND-2	Urbana	Peridomício	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente urbano com árvores frutíferas
AND-3	Rural	Peridomício	X	X	-	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para agricultura
AND-4	Rural	Peridomício	X	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
AND-5	Urbana	Hospital veterinário	-	-	X	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
AND-6	Rural	Peridomício	X	X		X	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
AND-7	Rural	Peridomício	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	X	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária

continua...

---

**ILHA SOLTEIRA**


---

Ecótopos	Área	Descrição	Animais domésticos								Animais silvestres <sup>a</sup>					Paisagem	
			<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Gallus gallus</i>	DIDELPHIMORPHIA	PILOSA	CINGULATA	RODENTIA	CARNIVORA		PRIMATA
IS-1	Rural	Abrigo de animais	X	X	X	X	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
IS-2	Urbana	Peridomicílio	X	X	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
IS-3	Rural	Peridomicílio	X	X	X	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para pecuária
IS-4	Rural	Peridomicílio	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	Ambiente modificado para agricultura
IS-5	Urbana	Abrigo de animais	-	X	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	Ambiente urbano com árvores nativas
IS-6	Urbana	UNESP <i>Campus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ambiente urbano com árvores nativas
IS-7	Urbana	Zoológico	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	X	X	X	Fragmento de floresta nativa

16 Nota: <sup>a</sup>considerando as principais ordens de mamíferos conhecidas como reservatórios de *Leishmania* spp. nas Américas, DIDELPHIMORPHIA (*Didelphis albiventris* e *D. aurita*), PILOSA  
17 (*Tamandua tetradactyla*), CINGULATA (*Dasyus novemcinctus*), RODENTIA (*Ratus rattus*), CARNIVORA (*Cerdocyon thous*), PRIMATA (*Alouatta guariba*) (2014).

18 Fonte: Elaborado pelo autor.

249           **Fauna de flebotomíneos**

250           As capturas sistematizadas e não sistematizadas revelaram 94 espécimes de  
251 flebotomíneos em Andradina, sendo 54 machos e 40 fêmeas (Tabela 3). Por outro lado,  
252 438 espécimes foram capturados na cidade de Ilha Solteira, 254 machos e 184 fêmeas  
253 (Tabela 3).

54 Tabela 3. Fauna de flebotomíneos coletados em capturas sistematizadas e não sistematizadas nas cidades de Andradina e Ilha Solteira, com  
 55 quantidade e porcentagem por sexo e espécie.

Espécies / Ecótopos	ANDRADINA														TOTAL		
	AND-1		AND-2		AND-3		AND-4		AND-5		AND-6		AND-7		♂	♀	♂♀
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀			
<i>Brumptomyia</i> spp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (1.06%)	1 (1.06%)
<i>Evandromyia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1 (1.06%)	1 (1.06%)
<i>Ev. (Ald) carmelinoi</i>	-	-	-	1	1	1	2	2	-	1	6	11	-	3	9 (9.57%)	19 (20.21%)	28 (29.79%)
<i>Ev. (Ald.) lenti</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	14	2	1	-	17 (18.09%)	2 (2.13%)	19 (20.21%)
<i>Ev. (Bar.) cortelezzii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1 (1.06%)	1 (1.06%)	2 (2.13%)
<i>Ev. (Bar.) Complexo cortelezzii</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1 (1.06%)	1 (1.06%)
<i>Lu. (Lu.) longipalpis</i>	-	-	8	5	2	1	-	-	1	-	5	2	7	1	23 (24.47%)	9 (9.57%)	32 (32.04%)
<i>Ny. neivai</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	2 (2.13%)	2 (2.13%)	4 (4.26%)
<i>Ny. whitmani</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1 (1.06%)	1 (1.06%)	2 (2.13%)
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	1 (1.06%)	3 (3.19%)	4 (4.26%)
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>27</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>54 (57.45%)</b>	<b>40 (42.55%)</b>	<b>94 (100%)</b>

continua...

**ILHA SOLTEIRA**

Espécies / Ecótopos	IS-1		IS-2		IS-3		IS-4		IS-5		IS-6		IS-7		TOTAL		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂♀
LUTZOMYIINA spp.	1	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	3 (0.68%)	1 (0.23%)	4 (0.91%)
<i>Brumptomyia</i> spp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	5 (1.14%)	5 (1.14%)
<i>Br. avellari</i>	9	9	-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	12	7	26 (5.94%)	18 (4.11%)	44 (10.05%)
<i>Br. brumpti</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0	7 (1.60%)	7 (1.60%)
<i>Evandromyia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	1 (0.23%)	1 (0.23%)
<i>Ev. (Ald.) carmelinoi</i>	23	17	-	1	-	1	12	10	-	-	-	-	3	6	38 (8.68%)	35 (7.99%)	73 (16.67%)
<i>Ev. (Ald.) lenti</i>	7	2	-	-	-	-	8	7	-	-	-	-	-	2	15 (3.42%)	11 (2.51%)	26 (5.94%)
<i>Ev. (Ald.) termitophila</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.23%)	0	1 (0.23%)
<i>Ev. (Bar.) cortelezii</i>	1	10	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	2 (0.46%)	13 (2.97%)	15 (3.42%)
<i>Ev. (Bar.) Complexo cortelezii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1 (0.23%)	1 (0.23%)
<i>Lu. (Lu.) longipalpis</i>	44	24	1	4	2	1	74	36	-	-	-	1	2	-	123 (28.08%)	66 (15.07%)	189 (43.15%)
<i>Nyssomyia</i> spp.	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	3 (0.68%)	3 (0.68%)
<i>Ny. neivai</i>	2	6	-	-	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	8 (1.83%)	9 (2.05%)	17 (3.88%)
<i>Ny. whitmani</i>	29	5	-	1	2	-	2	-	-	-	-	-	1	1	34 (7.76%)	7 (1.60%)	41 (9.36%)
<i>Psa. (For.) brasiliensis</i>	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2 (0.46%)	1 (0.23%)	3 (0.68%)
<i>Psa. (Xip.) hermanlenti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1 (0.23%)	1 (0.23%)
<i>Sc. sordellii</i>	-	-	-	-	1	2	1	3	-	-	-	-	-	-	2 (0.46%)	5 (1.14%)	7 (1.60%)
<b>TOTAL</b>	116	77	1	6	14	10	105	62	0	0	0	1	18	28	254 (57.99%)	184 (42.01%)	438 (100%)

56 Fonte: Elaborado pelo autor.

257 Quanto à identificação da fauna, foram encontradas doze espécies na área de  
 258 estudo distribuídas em três subtribos: BRUMPTOMYIINA - *Brumptomyia avellari*  
 259 (Costa Lima, 1932), *Br. brumpti* (Larrousse, 1920); LUTZOMYIINA – *Evandromyia*  
 260 (*Aldamyia*) *carmelinoi* (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986), *Ev. (Ald.) lenti*  
 261 (Mangabeira, 1938), *Ev. (Ald.) termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Ev.*  
 262 (*Barretomyia*) *cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Lu. (Lu.) longipalpis* (Lutz & Neivai, 1912),  
 263 *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927); PSYCHODOPYGINA - *Nyssomyia*  
 264 *neivai* (Pinto, 1926), *Ny. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Psathyromyia*  
 265 (*Forattiniella*) *brasiliensis* (Costa Lima, 1932), *Psa. (Xiphopsathyromyia) hermanlenti*  
 266 (Martins, Silva & Falcão, 1970) (Tabela 3).

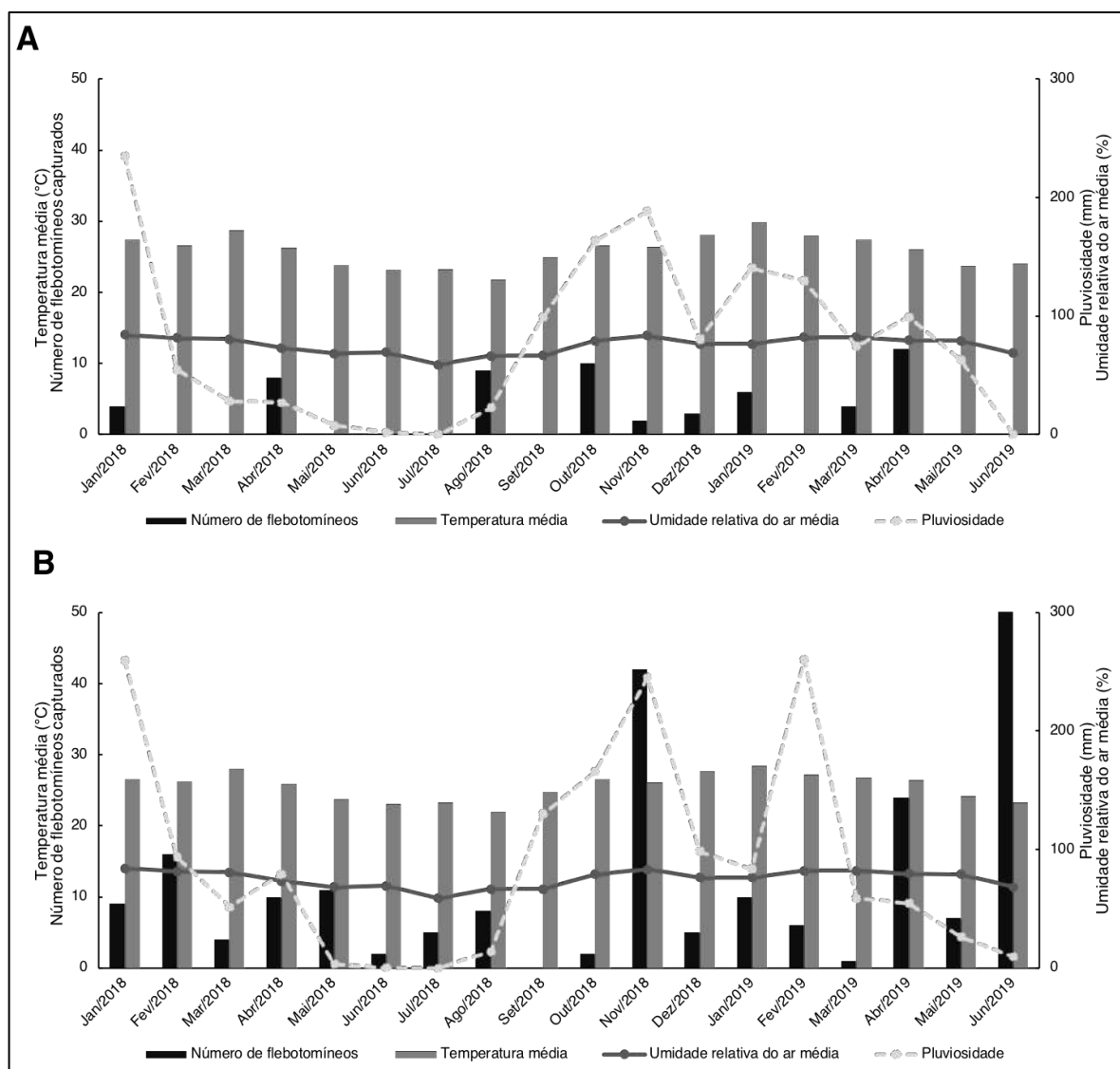
267 Sete espécies foram encontradas em Andradina e Ilha Solteira, e cinco  
 268 apareceram apenas nesta última cidade (Tabela 3). Quinze espécimes foram danificados  
 269 durante o manuseio e, devido a isso, a identificação ao nível de espécie foi prejudicada.  
 270 Assim, esses insetos foram identificados apenas no nível de tribo, LUTZOMYIINA (4  
 271 espécimes) e no gênero, *Brumptomyia* spp. (6 espécimes), *Evandromyia* spp. (2  
 272 espécimes), *Nyssomyia* spp. (3 espécimes) (Tabela 2). Além disso, não foi possível  
 273 definir a identificação entre *Ev. (Bar.) cortelezzii* ou *Ev. (Bar.) sallesi*, devido à  
 274 ausência do macho destas espécies nos mesmos ecótopos. Assim, esses espécimes  
 275 foram considerados como *Ev. (Bar.)* Complexo *cortelezzii* (Tabela 3).

## 276 **Sazonalidade dos flebotomíneos**

277 Setenta e nove flebotomíneos foram coletados através de capturas sistematizadas  
 278 em Andradina. O número de flebotomíneos e a distribuição dos dados climáticos  
 279 obtidos para a cidade são apresentados na Figura 2. Não foi observado associação  
 280 significativa, através das correlações de Spearman ( $\rho$ ) e de Pearson ( $r$ ), entre o número

281 mensal de insetos capturados e a temperatura ( $\rho = 0,461$ ;  $r = 0,123$ ), a umidade relativa  
 282 do ar ( $\rho = 0,528$ ;  $r = 0,156$ ) e a precipitação ( $\rho = 0,063$ ;  $r = 0,284$ ).

283 **Fig 2. Distribuição mensal de flebotomíneos capturados e os parâmetros climáticos**  
 284 **para as cidades de Andradina (A) e Ilha Solteira (B), estado de São Paulo, Brasil.**



285  
286

Fonte: Elaborado pelo autor.

287 Em Ilha Solteira, duzentos e dezessete flebotomíneos foram capturados por  
 288 coletas sistematizadas. A Figura 2 mostra o número de flebotomíneos capturados e a  
 289 distribuição dos dados climáticos mensais obtidos para a cidade. Novamente, não houve  
 290 associação, através das correlações estudadas, entre o número mensal de insetos

291 capturados e as variáveis climáticas de temperatura ( $\rho = 0,294$ ;  $r = -0,219$ ), umidade  
292 relativa do ar ( $\rho = 0,528$ ;  $r = -0,043$ ) e precipitação ( $\rho = 0,282$ ;  $r = -0,059$ ).

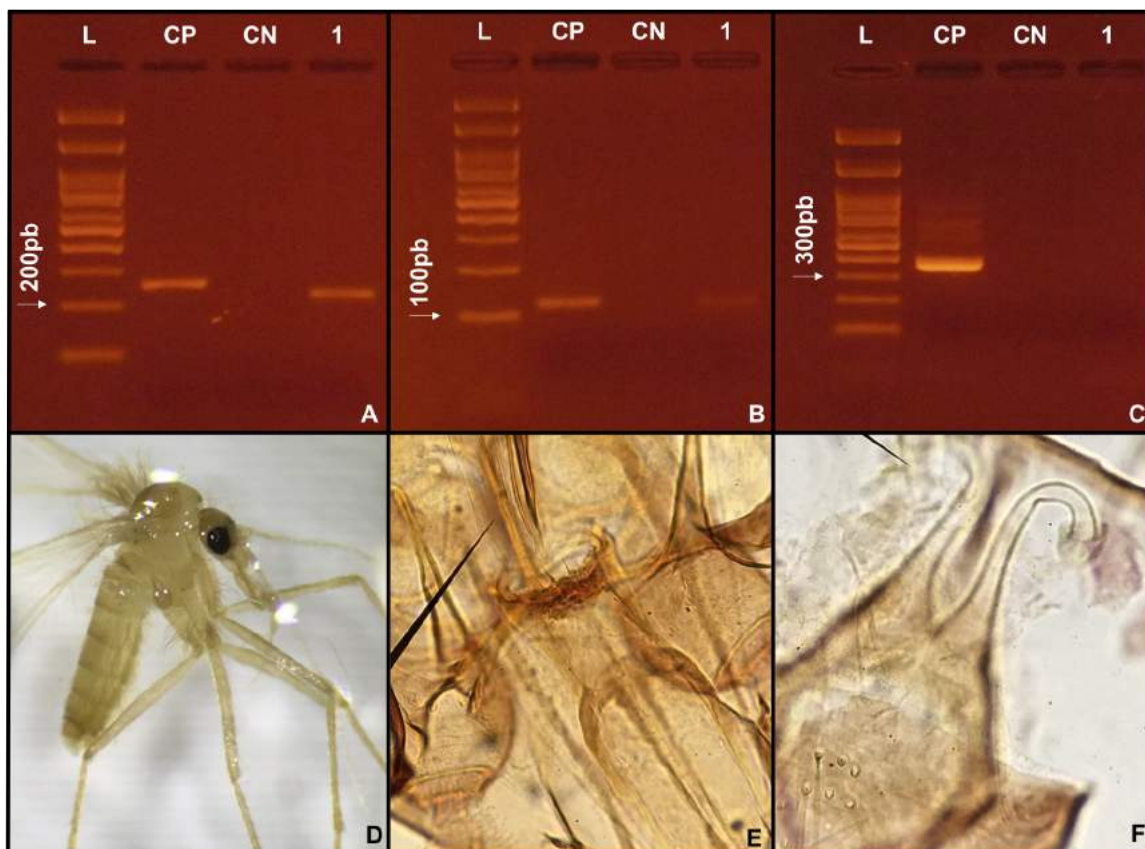
### 293 **Análises moleculares**

294 **Controle endógeno.** Duzentas vinte e quatro amostras de DNA de tórax e  
295 abdômen de fêmeas de flebotomíneos foram submetidas a PCR para a região IVS6 do  
296 gene de cacofonia de flebotomíneos, e assim confirmar a extração de DNA. Duas  
297 amostras (de Ilha Solteira) não apresentaram amplificação e foram excluídas das  
298 análises subsequentes. Dessa forma, um total de 222 amostras de DNA de fêmeas de  
299 flebotomíneos foram analisadas para a detecção de DNA de *Leishmania* spp.

300 **Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos.** A PCR para  
301 detecção de DNA de *Leishmania* spp. mostrou, uma *Ev. (Ald.) carmelinoi* positivo para  
302 *Leishmania* spp. kDNA, o que significa uma taxa natural de PCR positiva de 2,5%  
303 (1/40) das fêmeas de Andradina (Fig. 3). A PCR para a região genômica do ribossômico  
304 (rDNA) usando os genes ITS-1 e ITS-2 não mostraram amplificação, portanto, não foi  
305 possível definir a espécie de *Leishmania* por sequenciamento nesta amostra. Sob  
306 estereomicroscópico, nem sangue ou ovos foram observados no tórax e no abdômen  
307 dessa fêmea (Fig. 3). Não foram observadas fêmeas de flebotomíneos PCR positivo  
308 para o kDNA de *Leishmania* spp. na cidade de Ilha Solteira.



309 **Fig 3. Análise molecular por PCR do tórax e abdômen de uma fêmea de**  
 310 ***Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi* capturada na cidade de Andradina, estado de**  
 311 **São Paulo, Brasil.**



312  
 313 Fonte: Elaborado pelo autor.

314 Legenda: (A) gel de eletroforese em agarose a 2% para a região IVS6 do gene da cacofonia de  
 315 flebotomíneos (250pb) com 100pb DNA Ladder (KASVI) (L), DNA de *Lu. (Lu.) longipalpis* macho  
 316 (controle positivo) (CP), água ultrapura (controle negativo) (CN) e DNA de *Ev. (Ald.) carmelinoi* fêmea  
 317 (1); (B) gel de eletroforese em agarose a 2% para o gene do kDNA de *Leishmania* spp. (120pb) com  
 318 100pb DNA Ladder (KASVI) (L), DNA de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/pH8; FIOCRUZ)  
 319 (controle positivo) (CP), água ultrapura (controle negativo) (CN) e DNA de *Ev. (Ald.) carmelinoi* fêmea  
 320 (1); (C) gel de eletroforese em agarose a 1,5% para o gene do citocromo B (359pb) com 100pb DNA  
 321 Ladder (KASVI) (L), DNA de *Canis lupus familiaris* (controle positivo) (CP), água ultrapura (controle  
 322 negativo) (CN) e DNA de *Ev. (Ald.) carmelinoi* fêmea (1); (D) Fêmea de *Ev. (Ald.) carmelinoi*,  
 323 visualizada em estereomicroscópio no momento da secção da cabeça e terminália, para montagem em  
 324 lâminas de vidro e identificação de espécie pela visualização do cibário (E) e espermateca (F).

325           **Hospedeiros vertebrados de flebotomíneos.** A identificação das fontes de  
326 repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos foi realizada através da PCR para o gene  
327 CYT-B nas amostras de tórax e abdômen de fêmeas ingurgitadas, parcialmente  
328 ingurgitadas ou grávidas. Assim, 111 amostras de DNA fêmeas de flebotomíneos foram  
329 submetidas à caracterização da fonte de alimentação sanguínea. Vinte e três amostras  
330 (23/111; 20,7%) foram positivas para a PCR do gene CYT-B e em seguida,  
331 sequenciadas para identificação do hospedeiro vertebrado envolvido no repasto (Tabela  
332 4). O sequenciamento genético de um fragmento de 359pb mostrou 11 flebotomíneos  
333 alimentados com sangue de seis hospedeiros vertebrados: *Sus scrofa* (5/11; 45,5%),  
334 *Homo sapiens* (2/11; 18,2%), *Canis lupus familiaris* (1/11; 9,1%), *Bos taurus* (1/11;  
335 9,1%), *Gallus gallus* (1/11; 9,1%) e *Didelphis albiventris* (1/11; 9,1%) (Tabela 4). Doze  
336 amostras (12/23; 52,2%) foram descartadas pois o sequenciamento revelou amplificação  
337 de DNA do inseto (Tabela 4).

38 Tabela 4. Identificação de hospedeiros vertebrados de flebotomíneos pelo PCR do gene CYT-B, seguido de sequenciamento, nas cidades de Andradina  
 39 e Ilha Solteira, estado de São Paulo, Brasil.

ANDRADINA

Espécies	Fêmeas PCR CYT-B positivas	<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Didelphis albiventris</i>	Insecta
<i>Evandromyia</i> spp.	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ny. whitmani</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

ILHA SOLTEIRA

Espécies	Fêmeas PCR CYT-B positivas	<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Didelphis albiventris</i>	Insecta
<i>Br. avellari</i>	3	-	-	-	-	-	-	3
<i>Br. brumpti</i>	3	-	-	-	-	-	-	3
<i>Ev. (Ald.) carmelinoi</i>	3	-	-	-	1	-	1	1
<i>Lu. (Lu.) longipalpis</i>	5	2	1	-	1	1	-	-
<i>Ny. neivai</i>	4	-	-	1	2	-	-	1
<i>Ny. whitmani</i>	2	-	-	-	1	-	-	1
<i>Sc. sordellii</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>

40 Fonte: Elaborado pelo autor.

## 341 **Discussão**

342 Nesse trabalho a fauna de flebotomíneos e seus aspectos biológicos, como  
343 sazonalidade, taxa natural de PCR positivo para *Leishmania* spp. e o as fontes de  
344 repasto sanguíneo de flebotomíneos foram investigados em uma área endêmica para LT  
345 e LV no estado de São Paulo, Brasil (Fig 1). As cidades de Andradina e Ilha Solteira  
346 estão localizadas na mesorregião administrativa de Araçatuba, região Centro-Oeste do  
347 estado (Fig. 1). Essa é uma importante região considerada a “porta de entrada” da LV  
348 no estado, registrando os primeiros casos humanos e caninos [44]. Nessa área de estudo,  
349 capturas sistematizadas e não sistematizadas de flebotomíneos foram realizadas em  
350 quatorze ecótopos (sete para cada cidade). Esses pontos estavam localizados em áreas  
351 urbanas (ambiente urbano ou fragmentos de florestas nativas) ou rurais (ambiente  
352 modificado para agricultura ou pecuária). Em todos os pontos de captura, animais  
353 domésticos e/ou silvestres estavam presentes (Tabela 2).

354 Foram capturados 532 flebotomíneos nas cidades estudadas (Tabela 3). Cerca de  
355 57,9% (308/532) dos espécimes eram machos e outros 42,1% (224/532) fêmeas (Tabela  
356 3). A predominância de machos pode ser explicada por duas hipóteses: (1) os machos  
357 parecem emergir antes que as fêmeas [45,46]; (2) há uma intensa atividade dos machos  
358 nos abrigos de animais, como resultado da liberação de cairomônios pelos hospedeiros  
359 vertebrados, atraindo os machos e estimulando a formação de agregações para o  
360 acasalamento, como o observado para *Lu. (Lu.) longipalpis* [47]. Assim, o uso da  
361 armadilha luminosa próxima a abrigos de animais e/ou locais de reprodução de  
362 flebotomíneos (como neste estudo) tende a aumentar a proporção machos/fêmeas,  
363 também encontrada por outros autores [31].

364           Como se sabe, a abundância de espécies não pode ser estimada quando apenas as  
365 armadilhas luminosas são utilizadas [48]. No entanto, os dados obtidos durante longos  
366 períodos de coleta (um ano e meio, neste trabalho) podem dar uma ideia aproximada  
367 sobre a diversidade de espécies nas cidades estudadas [46]. Doze espécies de  
368 flebotomíneos foram encontradas na área de estudo. Sete espécies foram encontradas  
369 em ambas as cidades, enquanto cinco outras ocorreram apenas na cidade de Ilha Solteira  
370 (Tabela 3). Nessas áreas, foram encontradas duas espécies vetoras, *Lu. (Lu.) longipalpis*  
371 e *Ny. whitmani*, que são os principais responsáveis pela transmissão de *L. (L.) infantum*  
372 *chagasi* e *L. (Viannia) braziliensis*, respectivamente, no Brasil [7,8]. Considerando  
373 capturas sistematizadas e não sistematizadas, *Lu. (Lu.) longipalpis* foi a principal espécie  
374 de flebotomíneo capturada em quase todos os ecótopos, seja na área urbana ou rural de  
375 ambas as cidades (Tabela 2; Tabela 3). Além disso, esta espécie pôde ser capturada em  
376 qualquer época do ano. De fato, *Lu. (Lu.) longipalpis* parece estar completamente  
377 adaptado ao ambiente antrópico, como já observado em outras áreas [36].

378           No entanto, algumas outras espécies encontradas também merecem atenção, *Ev.*  
379 *(Ald.) lenti*, *Ny. neivai* e *Sc. sordelli* foram descritas infectadas por *L. (L.) infantum*  
380 *chagasi* e *L. (V.) braziliensis* [49,50]. Devido à falta de captura do macho de *Ev. (Bar.)*  
381 *cortelezzii* e *Ev. (Bar.) sallesi* nos pontos AND-3 e IS-7, não foi possível definir os  
382 espécimes das duas fêmeas capturadas nesses pontos (Tabela 2). A identificação  
383 específica da fêmea dessas espécies ocorre em associação com a dos machos, uma vez  
384 que há semelhanças morfológicas indistinguíveis entre as fêmeas dessas espécies [51].  
385 Assim, consideramos esses dois espécimes como *Ev. (Bar.)* Complexo *cortelezzii*  
386 (Tabela 3), indicando a possível ocorrência de *Ev. (Bar.) sallesi* na área de estudo. De  
387 todo o modo, espécimes de *Ev. (Bar.) cortelezzii*, *Ev. (Bar.) sallesi* e *Ev. (Bar.)*  
388 Complexo *cortelezzii* foram encontrados infectado naturalmente pelos agentes  
389 etiológicos de TL e VL [49,50,52].

390 Estudos sobre a sazonalidade de flebotomíneos tentam sobre tudo, entender  
391 quais fatores climáticos podem favorecer ou desfavorecer a biologia desses insetos, e  
392 quais as suas implicações na epidemiologia das leishmanioses em uma região [53]. O  
393 número de flebotomíneos capturados em capturas sistematizadas em Andradina e Ilha  
394 Solteira foram comparados com os dados climáticos mensais de cada cidade (Figura 2).  
395 Na mesma região, a estação chuvosa mostrou uma correlação significativa com a  
396 abundância de flebotomíneos [31]. Embora tenhamos observado uma tendência de  
397 maior de captura na primavera e no verão (entre setembro e março) sem correlação  
398 significativa. Em ambas as cidades, observamos capturas distribuídas em todas as  
399 estações do ano (Figura 2). Além disso, não foi encontrada correlação de Spearman ou  
400 de Pearson entre o número mensal de flebotomíneos capturados com as variáveis  
401 climáticas de temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade. Nossos achados  
402 coincidem com Spada et al. [54], que observaram numerosas capturas após picos de  
403 chuva na cidade de Ilha Solteira, contudo, sem correlação significativa com essa ou  
404 outra variável climática. Em contrário, outros autores reportaram que a temperatura e  
405 umidade relativa do ar foram correlacionadas com a densidade mensal de flebotomíneos  
406 capturados [31,53]. A grande dificuldade desses estudos é o fato de requererem um  
407 longo acompanhamento dessas populações. Além disso, mudanças causadas pela  
408 presença humana, como a manutenção de animais (fonte de alimento) e matéria  
409 orgânica (nicho reprodutivo) podem influenciar a densidade de flebotomíneos em uma  
410 área, desempenhando um papel tão importante quanto o clima da região em estudo [55].  
411 No entanto, esses trabalhos são extremamente fundamentais para a compreensão da  
412 epidemiologia das leishmanioses, pois podem ajudar a prever ações de controle para  
413 esses insetos em momentos mais adequados [53].

414 A detecção de DNA de *Leishmania* spp. e a identificação dos hospedeiros  
415 vertebrados foram realizadas. Dessa forma, o DNA extraído de todas as 224 amostras de

416 tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos foram submetidas a PCR para a região  
417 IVS6 do gene da cacofonia de Phlebotominae. A PCR de controle endógeno revelou  
418 222 amostras positivas, confirmando assim, a qualidade no processo de extração do  
419 DNA e excluindo a possibilidade de falsos negativos decorrentes de inibição na PCR ou  
420 degradação da amostra. Assim, um banco de DNA de 222 amostras de tórax e abdômen  
421 de fêmeas capturadas foram submetidas às análises subsequentes.

422 Estudos investigando a presença de *Leishmania* spp. em flebotomíneos são  
423 fundamentais nos estudos epidemiológicos das leishmanioses, pois podem fornecer  
424 informações que ajudam a elucidar os padrões de transmissão em uma área [23,56]. Eles  
425 também são indicadores importantes da intensidade de transmissão do parasita em uma  
426 área [57]. A taxa de infecção natural é tradicionalmente estimada por dissecção das  
427 fêmeas com a visualização microscópica de *Leishmania* spp. em seus intestinos [58].  
428 No entanto, essa técnica possui baixa sensibilidade [38,58]. Assim, métodos  
429 moleculares, como a PCR, vêm sendo utilizados nesses estudos epidemiológicos para  
430 determinar a taxa de infecção natural de flebotomíneos [56,58]. Em nossa análise,  
431 encontramos 2,5% (1/40) das fêmeas de flebotomíneos naturalmente PCR positivas para  
432 o kDNA de *Leishmania* spp. na cidade de Andradina. Esta taxa de infecção natural de  
433 *Leishmania* spp. é maior que a encontrada por Galvis-Ovallos et al. [31] em outra  
434 cidade nessa mesma região. Normalmente, a taxa natural de infecção por *Leishmania*  
435 spp. em flebotomíneos relatada pela maioria dos estudos é muito baixa, raramente  
436 atingindo 1% [49]. Não foi encontrado nenhuma fêmea de flebotomíneos positiva para a  
437 PCR do kDNA de *Leishmania* spp. na cidade de Ilha Solteira.

438 Nesse trabalho, a detecção do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada pela PCR  
439 no para o kDNA de *Leishmania* spp. Essa PCR é considerada muito sensível na  
440 detecção de parasitas em flebotomíneos, apresentando um limiar de detecção de 0,004

441 parasitas [58]. Embora espécies vetoras tenham sido encontradas na área de estudo,  
442 nenhuma fêmea dessas espécies fora positiva para o kDNA de *Leishmania* spp. No  
443 entanto, encontramos o kDNA do parasita em uma fêmea não ingurgitada de *Ev. (Ald.)*  
444 *carmelinoi* (Fig 3) em área rural (ecótopo AND-6) da cidade de Andradina (Tabela 2).  
445 Até o nosso conhecimento, este é o primeiro relato desta espécie PCR positiva para o  
446 DNA do parasita. A PCR para o kDNA de *Leishmania* spp. utilizada, embora tenha  
447 grande sensibilidade, é incapaz de determinar a espécie de *Leishmania* spp. Assim,  
448 utilizamos a PCR com alvo no rDNA de *Leishmania* spp. usando as regiões ITS-1 e  
449 ITS-2, que permitem a identificação de espécies através de sequenciamento.  
450 Infelizmente, não houve amplificação para esses genes, portanto, não foi possível  
451 definir a espécie de *Leishmania* nessa amostra.

452         Nesse estudo encontramos o DNA de *Leishmania* spp. em uma espécie não  
453 vetora de flebotomíneo, fato também relatado por Lana et al. [50]. Essa descoberta deve  
454 ser interpretada com cautela. A simples detecção de DNA de *Leishmania* spp. em uma  
455 fêmea de *Ev. (Ald.) carmelinoi* não implica que essa espécie desempenhe um papel na  
456 transmissão de leishmanioses [50]. A presença de DNA nessa amostra, pode ser  
457 resultado do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. No entanto, não foram  
458 encontrados resquícios de sangue no abdômen da fêmea em questão, nem pela  
459 visualização em estereomicroscópio nem pela PCR para o gene CYT-B (Fig 3).  
460 Infecções experimentais e estudos de competência vetorial são necessários para elucidar  
461 a relação entre o parasita e a espécie de flebotomíneo encontrada parasitada nesse  
462 estudo [49,50].

463         Juntamente com os estudos de infecção natural por *Leishmania* spp., as  
464 investigações para caracterização das fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos  
465 possuem grande valor epidemiológico [16]. Através desses estudos, é possível



466 identificar os hospedeiros vertebrados que frequentemente são fontes de repasto  
467 sanguíneo desses insetos e assim, fornecem dados indiretos sobre possíveis  
468 reservatórios de *Leishmania* spp. em uma região [16,59]. Em nosso estudo, as capturas  
469 com armadilhas de luz do tipo CDC revelaram fêmeas: ingurgitadas (4), parcialmente  
470 ingurgitadas (18) e grávidas (89). Apesar de amplamente utilizada nos estudos de  
471 hábitos alimentares de flebotomíneos, neste estudo as armadilhas luminosas não foram  
472 eficientes na captura de fêmeas ingurgitadas ou parcialmente ingurgitadas, também  
473 relatado por Forattini et al. [60]. Esse fato, talvez, possa ser explicado pelo padrão de  
474 comportamento das fêmeas de flebotomíneos que, após o repasto do sangue, tornam-se  
475 menos ativas, pousando para digestão do sangue, e assim menos atraídas pela fonte de  
476 luz.

477         No total, 111 fêmeas de flebotomíneos (ingurgitadas, parcialmente ingurgitadas  
478 e grávidas) foram submetidos à caracterização das fontes alimentares de sangue pelo  
479 PCR do gene CYT-B. Decidimos usar as fêmeas grávidas na tentativa de encontrar  
480 restos de sangue de vertebrados usados na maturação dos ovos. Vinte e três amostras  
481 apresentaram um fragmento 359pb para o gene CYT-B e foram submetidas ao  
482 sequenciamento (Tabela 4). A identificação da espécie de vertebrado envolvido no  
483 repasto sanguíneo foi possível apenas em 11 fêmeas de flebotomíneos de quatro  
484 espécies: *Ev. (Ald.) carmelinoi*, *Lu. (Lu.) longipalpis*, *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* (Tabela  
485 4).

486         Nesse estudo, encontramos flebotomíneos alimentados com sangue de seis  
487 hospedeiros vertebrados (Tabela 4). Foi possível identificar as fontes de alimentares em  
488 flebotomíneos capturados nos ecótopos da cidade de Ilha Solteira (IS-1, IS-2, IS-3, IS-4,  
489 IS-7) (Tabela 2). Todas as identificações das espécies de vertebrados correspondem à  
490 fauna observada em cada ecótopo na área de estudo. Os suínos foram a principal fonte

491 de repasto sanguíneo (45,5%), seguido por humanos (18,2%), cães, bovinos, galinhas e  
492 gambás (9,1% cada) (Tabela 4). Como lembrado por Paternina et al. [61], nossos  
493 resultados não inferem necessariamente um hábito preferencial desses insetos para esses  
494 mamíferos. Embora tenhamos caracterizado a fauna de cada ecótopo, não foi realizado  
495 um levantamento quantitativo da abundância e disponibilidade relativa de cada espécie  
496 de vertebrado. No entanto, nossos resultados podem ajudar a entender o perfil de  
497 hospedeiros vertebrados de flebotomíneos na área de estudo.

498 Hábitos alimentares em suínos também foram relatados por outros estudos  
499 [22,62]. Esta espécie foi a alvo de quatro espécies de flebotomíneos, incluindo *Lu. (Lu.)*  
500 *longipalpis* (vetor LV), *Ny. whitmani* (vetor LT) e *Ny. neivai* (vetor suspeito de LT)  
501 (Tabela 4). Mesmo em baixa frequência, as galinhas também foram fontes de sangue  
502 para *Lu. (Lu.) longipalpis* (Tabela 4). Embora as galinhas sejam resistentes à infecção  
503 por *Leishmania* spp., elas sofrem frequentemente o repasto sanguíneo de *Lu. (Lu.)*  
504 *longipalpis* [63]. Como já bem determinado, o galinheiro é um bom criadouro para esta  
505 espécie de flebotomíneo [64]. Além disso, porcos e galinhas podem influenciar a  
506 dinâmica populacional de flebotomíneos em uma área, atraindo o vetor para  
507 peridomicílio e contribuindo para o aumento do risco de infecção por *Leishmania* spp.  
508 no bairro [55]. Nossos achados reforçam a importância dessas espécies de vertebrados  
509 como amplificadores da população de vetores no peridomicílio da área em estudo.

510 Nós encontramos uma fêmea de *Lu. (Lu.) longipalpis* alimentada com sangue de  
511 cão (*Canis lupus familiaris*). Como sabemos, os cães são considerados o principal  
512 hospedeiro reservatório de LV no ambiente doméstico [10]. A prevalência de  
513 leishmaniose visceral canina (CVL) é estimada em cerca de 14,5% na Ilha Solteira [65].  
514 Nenhum dos espécimes fêmeas de *Lu. (Lu.) longipalpis* capturados neste estudo foram  
515 positivas para o kDNA de *Leishmania* spp. No entanto, a substancial prevalência de

516 CVL e a importante presença do vetor de LV no peridomicílio (Tabela 2) constituem o  
517 nicho de transmissão de LV nesta cidade e em outras áreas urbanas endêmicas do  
518 Brasil. Uma vez que, essa espécie de flebotomíneo também apresentou hábitos  
519 antropofílicos na cidade (Tabela 4), também relatado por Carvalho et al. [36].

520 Outro importante reservatório de LV é o gambá (*Didelphis albiventris*)  
521 encontrado infectado por *L. (L.) infantum chagasi* [66] e sendo incriminado como um  
522 fator de risco associado à infecção por *L. (L.) infantum* no peridomicílio [67]. Uma  
523 fêmea de *Ev. (Ald.) carmelinoi* foi encontrada ingurgitada por sangue de gambá na  
524 cidade de Ilha Solteira. Esse achado comprova as relações biológicas entre essa espécie  
525 de flebotomíneo e esse importante reservatório silvestre de LV. Embora não  
526 conseguimos identificar a espécie de *Leishmania* spp., essa estreita relação entre essas  
527 espécies pode explicar a detecção do kDNA de *Leishmania* spp. em uma fêmea de *Ev.*  
528 (*Ald.) carmelinoi* na cidade de Andradina (Fig. 3).

529 Curiosamente, encontramos uma fêmea de *Ny. neivai* (vetor suspeito de LT)  
530 alimentada com sangue de bovino (*Bos taurus*). Os bovinos foram apontados pela  
531 primeira vez como potencial reservatório para *Leishmania* spp. na Índia [68].  
532 Posteriormente, casos de bovinos infectados por *Leishmania* spp. foram relatados na  
533 Suíça, China, Índia e Brasil [69–72]. Uma fêmea de *Lu (Lu.) longipalpis* alimentada em  
534 um bovino também foi relatada em outra área endêmica do Brasil [73]. Mesmo assim, o  
535 papel dos bovinos na epidemiologia das leishmanioses precisa ser mais elucidado, nosso  
536 achado corrobora a preocupação com a presença desses animais em pequenas áreas  
537 (como o peridomicílio) [72], compartilhando o mesmo ambiente com suínos, galinhas,  
538 cães, humanos e espécies vetoras de flebotomíneos (ecótopo IS-1) (Tabela 2; Tabela 3).

539 Estudos sobre os hábitos alimentares de flebotomíneos são descritos utilizando  
540 provas sorológicas ou moleculares. As ferramentas moleculares, têm mostrado

541 identificação de fontes alimentares com maior grau de sensibilidade e especificidade  
542 [59]. No entanto, nesse estudo, algumas limitações foram observadas em relação a essa  
543 abordagem. Observamos baixa sensibilidade da PCR do gene CYT-B. Apenas 20,7%  
544 (23/111) das amostras foram positivas. Essa baixa taxa de positividade foi relatada por  
545 outros autores, que acreditam estar relacionada à quantidade de sangue e ao tempo de  
546 digestão após o repasto sanguíneo [36,74]. Nesse trabalho, 60% (3/5) das amostras de  
547 fêmeas ingurgitadas, 50% (9/18) das parcialmente ingurgitadas e 12% (11/89) das  
548 grávidas foram positivas para na PCR do gene CYT-B, confirmando as observações  
549 anteriores. Além disso, após o sequenciamento, apenas 11 amostras tiveram a fonte  
550 alimentar determinada com sucesso. Cerca de 12 amostras foram descartadas por  
551 revelarem sequências de insetos, o que também foi relatado por Paternina et al. [61]. Em  
552 nossa análise, todas essas sequências foram obtidas de amostras de DNA de tórax e  
553 abdômen de fêmeas de flebotomíneos com baixa quantidade de sangue (parcialmente  
554 ingurgitadas ou grávidas). Com todas essas observações, reafirmamos outros autores,  
555 que disseram que a PCR do gene CYT-B funciona satisfatoriamente apenas para  
556 amostras de fêmeas com recente ingurgitamento completo [36,74].

557       Em geral, nossos resultados sobre a identificação de fontes de repasto sanguíneo  
558 de flebotomíneos confirmam o oportunismo desses insetos, com a habilidade de se  
559 alimentar em uma grande variedade de vertebrados [16,17], destacando as relações  
560 biológicas entre as espécies vetoras e a fauna local de mamíferos vertebrados, incluindo  
561 os seres humanos [61].

562       Por fim, atualmente temos observado que as atividades humanas têm levado a  
563 mudanças no padrão de transmissão de LT e LV [75]. Uma melhor compreensão do  
564 ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. exige que todas as relações entre o parasita, o  
565 vetor e o hospedeiro vertebrado reservatório sejam determinadas e esclarecidas [49]. Os

566 estudos dos flebotomíneos são conduzidos pelo papel fundamental desses insetos na  
567 epidemiologia da doença [48]. Assim, vários estudos têm demonstrado o dinamismo  
568 dessa população de dípteros e chamaram a atenção para a necessidade de vigilância  
569 entomológica contínua para conter a disseminação da doença [75]. Nossos resultados  
570 trazem novas informações sobre a bioecologia dos flebotomíneos no Novo Mundo.

## 571 **Conclusão**

572 Os resultados revelaram vetores comprovados e suspeitos nos ciclos  
573 epidemiológicos de LT e LV na área de estudo, mas não foram encontrados padrões  
574 sazonais entre fatores climáticos e a fauna de insetos. O kDNA de *Leishmania* spp. foi  
575 detectado em uma fêmea não ingurgitada de *Ev. (Ald.) carmelinoi*. Além disso, foi  
576 comprovado que seis espécies de mamíferos (suínos, humanos, cães, bovinos, galinhas e  
577 gambás) são importantes hospedeiros de flebotomíneos na área de estudo.

## 578 **Agradecimentos**

579 Os autores agradecem aos moradores das cidades de Andradina e Ilha Solteira,  
580 estado de São Paulo, Brasil, que permitiram a captura de flebotomíneos durante o longo  
581 período desse trabalho.

## 582 **Declaração de ética**

583 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da  
584 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ-  
585 USP) sob o número de registro CEUA 3005290817.

586

587 **Financiamento**

588 Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do  
589 Estado de São Paulo (FAPESP), projeto número 2017/23436 – 0 e da Coordenação de  
590 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de  
591 Financiamento 001.

592 **Conflito de interesses**

593 Os autores declaram que não há conflito de interesses.

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608        **Referências**

- 609    1.    Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis  
610        worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 2012/06/14.  
611        2012;7(5):e35671.
- 612    2.    Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al.  
613        *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol Aspects Med**.  
614        2017;57:1–29.
- 615    3.    Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**.  
616        2006;22(12):552–7.
- 617    4.    Marcussi LM, Skraba CM, Perles TF, Pedroso RB, Lonardon MVC, Silveira  
618        TGV. Evaluation of specific primers for species identification of *Leishmania (V.)*  
619        *braziliensis*. **Rev Patol Trop**. 2013;42(1):64–71.
- 620    5.    World Health Organization [WHO]. Geneva: **Leishmaniasis – Fact sheet**  
621        Updated 2019 March 14. 2019. Available from: [https://www.who.int/en/news-](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis)  
622        [room/fact-sheets/detail/leishmaniasis](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).
- 623    6.    Pan American Health Organization [PAHO]. **Leishmanioses: Informe**  
624        **Epidemiológico das Américas**: Washington: Pan American Health  
625        Organization; n. 5, 2017. p. 19. Available from:  
626        [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&It](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)  
627        [emid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)
- 628    7.    Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de  
629        Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**  
630        **americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

- 631 8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de  
632 Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose**  
633 **visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- 634 9. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al.  
635 Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing  
636 incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral  
637 leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiol Infect.** 2018;146(3):401–6.
- 638 10. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic  
639 visceral leishmaniasis. **Parasitology.** 2009;136(14):1915–34.
- 640 11. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine  
641 sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health  
642 concern. **Med Vet Entomol.** 2013;27(2):123–47.
- 643 12. Shimabukuro PHF, De Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand  
644 flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, species, and their  
645 distribution. **Zookeys.** 2017;2017(660):67–106.
- 646 13. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clin**  
647 **Dermatol.** 1999;17(3):279–89.
- 648 14. Dantas-torres F, Andrade AJ De, Emanuela K, Tenório R, Dilermando J.  
649 Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of  
650 Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2010;43(6):733–6.
- 651 15. Schlein Y, Warburg A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus*  
652 *papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **J Med Entomol.**  
653 1986;23(1):11–5.



- 654 16. Andrade Barata R, França-Silva JC, Mayrink W, Costa Da Silva J, Prata A,  
655 Seixas Lorosa E, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de  
656 flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev**  
657 **Soc Bras Med Trop.** 2005;38(5):421–5.
- 658 17. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Weigl S, Tarallo VD, Parisi A, Traversa D, et al.  
659 Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies  
660 (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. **Acta Trop** [Internet]. 2011;119(2–  
661 3):91–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.013>
- 662 18. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne  
663 viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Euro**  
664 **Surveill** [Internet]. 2010 Mar 11 [cited 2019 Sep 3];15(10):19507. Available  
665 from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403307>
- 666 19. Werneck GL. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude**  
667 **Publica.** 2010;26(4):645.
- 668 20. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania*  
669 species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl** [Internet].  
670 2014;3(3):251–62. Available from:  
671 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- 672 21. Dias F de OP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a  
673 peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae,  
674 Phlebotominae). **Cad Saude Publica.** 2003;19(5):1373–80.
- 675 22. Baum M, Castro EAD, Cristina MP, Goulart TM, Baura W, Débora do Rocio  
676 Klisiowicz DDR, Costa-Ribeiro MCVD. Molecular detection of the blood meal

- 677 source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American  
678 cutaneous. **Acta Trop** [Internet]. 2015;143:8–12. Available from:  
679 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006>
- 680 23. Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES.  
681 Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally  
682 infected individual Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae:  
683 Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2002;44(5):255–9.
- 684 24. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med**  
685 **Vet Entomol**. 1990;4(1):1–24.
- 686 25. Alexander B, Maroli M. Control of Phlebotomine sandflies. **Med Vet Entomol**.  
687 2003;17(1):1–18.
- 688 26. Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of blood meals imbibed by  
689 Phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting.  
690 **Vector-Borne Zoonotic Dis**. 2009;9(1):79–86.
- 691 27. Setzer J. **Atlas Climático e Ecológico do Estado de São Paulo**. Ed. Comissão  
692 Interestadual da Bacia do Paraná-Uruguai em colaboração com as centrais  
693 elétricas de SP. CESP. São Paulo, p. 35–9.
- 694 28. Ab'Saber AN. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do  
695 Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**. 1977;3:19.
- 696 29. Brasil. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana: Casos**  
697 **Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de**  
698 **Notificação – 2007 a 2017 - São Paulo**. [Internet]. [cited 2019 Aug 5]. Available  
699 from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgiexe?sinanet/cnv/ltsaspedf>

- 700 30. Brasil. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral: Casos Confirmados**  
701 **Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - 2007 a**  
702 **2017 - São Paulo**. [Internet]. [cited 2019 Aug 5]. Available from:  
703 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgiexe?sinanet/cnv/leishvspdef>
- 704 31. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá A da P, Galati EAB. Ecological parameters  
705 of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis*  
706 complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. **Parasites and**  
707 **Vectors**. 2017;10(1):1–9.
- 708 32. Forattini OP. **Entomologia Médica**. Psychodidae. Phlebotominae.  
709 Leishmanioses. 4th ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda; 1973. 658 p.
- 710 33. Galati EAB. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera:**  
711 **Psychodidae)**. Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I.  
712 [Internet]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo;  
713 2018. 132 p. Available from: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>
- 714 34. Marcondes CB. a Proposal of Generic and Subgeneric Abbreviations for  
715 Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World.  
716 **Entomol News**. 2007;118(4):351–6.
- 717 35. Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T. Multilocus and singlelocus  
718 DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR, editor. **Multilocus and singlelocus DNA**  
719 **fingerprinting**. 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1998. p. 287–336.
- 720 36. Carvalho GML, Rêgo FD, Tanure A, Silva ACP, Dias TA, Paz GF, et al.  
721 Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil,  
722 using the cytochrome b PCR method. **J Med Entomol**. 2017;54(4):1049–54.

- 723 37. Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et  
724 al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Mol**  
725 **Biol** [Internet]. 2002;11(2):117–22. Available from:  
726 [http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11966876)  
727 [&D=med4&AN=11966876](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=11966876)
- 728 38. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho ÁL, de Figueiredo  
729 Barbosa A, et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and  
730 *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro  
731 (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans R**  
732 **Soc Trop Med Hyg.** 2005;99(12):905–13.
- 733 39. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool  
734 in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.** 1990;71(3):267–75.
- 735 40. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity  
736 of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania*  
737 *donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation  
738 polymorphisms and sequencing. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2000;94(5):575–  
739 9.
- 740 41. Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH. PCR-RFLP analysis: A promising  
741 technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera:  
742 Glossinidae). **Parasitol Res.** 2005;97(3):247–54.
- 743 42. CIIAGRO. **Centro integrado de informações agrometeorológicas** [Internet].  
744 Available from: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>.
- 745 43. R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical**

- 746           **computing**. [Internet]. R Foundation for Statistical Computing. 2014. Available  
747           from: <http://www.r-project.org>
- 748   44.   Cardim MFM, Guirado MM, Dibo MR, Chiaravalloti Neto F. Visceral  
749           leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis.  
750           **Rev Saude Publica**. 2016;50:1–11.
- 751   45.   Chaniotis BN. The biology of californica *Phlebotomus*. **J Med Entomol**. 1967  
752           May;4(2):221-33.
- 753   46.   Galati EAB, Nunes VLB, Rego FDA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de  
754           flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no  
755           Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Saude Publica**. 1997;31(4):378–90.
- 756   47.   Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the  
757           sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Anim Behav**. 1997;53(4):721–31.
- 758   48.   Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal  
759           variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its  
760           relationship to enzootic rodent Leishmaniasis (*Leishmania mexicana*  
761           *amazonensis*). **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1972;66(5):709–17.
- 762   49.   Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL,  
763           Andrade Filho JD. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi*  
764           (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J Med**  
765           **Entomol**. 2009 Sep;46(5):1159-63.
- 766   50.   Lana RS, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FDO,  
767           Lima ACVMDR, et al. Phlebotomine sand fly fauna and leishmania infection in  
768           the vicinity of the serra do cipó national park, a natural brazilian heritage site.

- 769 **Biomed Res Int.** 2015;2015.
- 770 51. Carvalho GML, Brazil RP, Falcão AL, Filho JDA. Distribuição geográfica do  
771 complexo *cortelezzii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil. **Neotrop**  
772 **Entomol.** 2009;38(6):876–9.
- 773 52. Carvalho GML, Filho JDA, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF.  
774 Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil.  
775 **Vector-Borne Zoonotic Dis.** 2008;8(3):407–14.
- 776 53. Saraiva L, Dos Santos Lopes J, Machado Oliveira GB, De Assis Batista F, Falcão  
777 AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em  
778 área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e  
779 Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2006;39(1):56–63.
- 780 54. Spada JCP, Silva DT da, Martins KRR, Rodas LAC, Alves ML, Faria GA, et al.  
781 Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral  
782 leishmaniasis in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Rev Bras Parasitol**  
783 **Veterinária.** 2014;23(4):456–62.
- 784 55. Teodoro U, Salvia Filho VL, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira  
785 ME, et al. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na  
786 região norte do Estado do Paraná-Brasil: Variação sazonal e atividade noturna.  
787 **Rev Saude Publica.** 1993;27(3):190–4.
- 788 56. González E, Álvarez A, Ruiz S, Molina R, Jiménez M. Detection of high  
789 *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the  
790 leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR.  
791 **Acta Trop** [Internet]. 2017;171: 68–73. Available from:

- 792 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023>
- 793 57. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al.  
794 Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania*  
795 infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic  
796 focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Trop.**  
797 2008;105(2):158–65.
- 798 58. Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ÉS, Luciano MCS, Bevilaqua  
799 CML. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis*  
800 sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods.  
801 **Exp Parasitol** [Internet]. 2011;129(3):234–9. Available from:  
802 <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.08.010>
- 803 59. Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. Development  
804 of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood  
805 meal analysis in the insect vectors. **Am J Trop Med Hyg.** 2007;77(6):1054–9.
- 806 60. Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências  
807 alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev**  
808 **Saude Publica.** 1987;21(3):171–87.
- 809 61. Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-  
810 Gómez M, Martínez L, et al. Evidence for anthropophily in five species of  
811 Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia,  
812 revealed by molecular identification of bloodmeals. **Acta Trop** [Internet].  
813 2016;153:86–92. Available from:  
814 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.005>

- 815 62. Bravo-Barriga D, Parreira R, Maia C, Afonso MO, Blanco-Ciudad J, Serrano FJ,  
816 et al. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in Phlebotomine  
817 sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and  
818 risk factors associated. **Acta Trop** [Internet]. 2016;164:414–24. Available from:  
819 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.003>
- 820 63. de Ávila MM, Brilhante AF, de Souza CF, Bevilacqua PD, Galati EAB, Brazil  
821 RP. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of Phlebotomine  
822 sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in  
823 the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasit Vectors** [Internet]. 2018  
824 Dec 26 [cited 2019 Sep 3];11(1):64. Available from:  
825 [https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-](https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2641-y)  
826 [2641-y](https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2641-y)
- 827 64. Casanova C, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Marcoris MLG, Colla-Jacques  
828 FE, Prado ÂP. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:  
829 Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern  
830 Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013;7(9):21–3.
- 831 65. Paulan S de C, Silva HR, Lima EAC de F, Flores EF, Tachibana VM, Kanda CZ,  
832 et al. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São  
833 Paulo, Brazil. **Eng Agrícola** [Internet]. 2012;32:765–74. Available from:  
834 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162012000400016&nrm=iso)  
835 [69162012000400016&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162012000400016&nrm=iso)
- 836 66. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of  
837 Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [Internet]. 1996;91:671–83. Available  
838 from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-)



839 02761996000600003&nrm=iso

- 840 67. Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS. Are opossums a relevant  
841 factor associated with asymptomatic *Leishmania infection* in the outskirts of the  
842 largest Brazilian cities? **Brazilian J Infect Dis** [Internet]. 2016;20(2):119–26.  
843 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.11.013>
- 844 68. Killick-Kendrick R. Are cattle a reservoir host of kala-azar in India? **Trans R Soc**  
845 **Trop Med Hyg** 1990; 84(5): 754. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(90)90181-D)  
846 [9203\(90\)90181-D](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(90)90181-D). PMID:2278094.
- 847 69. Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, et al.  
848 An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Vet**  
849 **Parasitol.** 2010;169(3–4):408–14.
- 850 70. Singh N, Mishra J, Singh R, Singh S. Animal reservoirs of visceral leishmaniasis  
851 in India. **J Parasitol.** 2013;99(1):64–7.
- 852 71. Gao CH, Wang JY, Zhang S, Yang YT, Wang Y. Survey of wild and domestic  
853 mammals for infection with *Leishmania infantum* following an outbreak of desert  
854 zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People’s Republic of China. **PLoS One.**  
855 2015;10(7):1–9.
- 856 72. Vioti G, Leonel JAF, Lemes KM, Oliveira VF, Ferreira HL, Keid LB, Madureira  
857 EH, Soares RM, Benassi JC, Oliveira TMFS. Molecular detection of *Leishmania*  
858 spp. in cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1.  
859 **Rev Bras Parasitol Veterinária.** 2019;2961(june):303–5.
- 860 73. Guimarães-E-Silva AS, De Oliveira Silva S, Da Silva RCR, Pinheiro VCS,  
861 Rebêlo JMM, Melo MN. *Leishmania* infection and blood food sources of

- 862 Phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary  
863 leishmaniasis. **PLoS One**. 2017;12(8):1–19.
- 864 74. Sant’Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ,  
865 Cavalcante RR, et al. Blood meal identification and parasite detection in  
866 laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA  
867 databasing paper. **Acta Trop**. 2008;107(3):230–7.
- 868 75. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera,  
869 Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua  
870 distribuição geográfica. **Biota Neotrop**. 2011;11(suppl 1):685–704.
- 871 76. QGIS Development Team. **QGIS Geographic Information System**. [Internet].  
872 Open Source Geospatial Foundation Project. 2016. Disponível em:  
873 <http://qgis.osgeo.org>.
- 874 77. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]. **Estrutura territorial**  
875 [Internet]. 2018. Disponível em:  
876 [https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-](https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15774-malhas.html?=&t=acesso-ao-produto)  
877 [territorial/15774-malhas.html?=&t=acesso-ao-produto](https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15774-malhas.html?=&t=acesso-ao-produto).

878

879

## 5. ARTIGO 2

### 1 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS INDIVIDUAIS DE 2 FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE): QUAL 3 O MELHOR MÉTODO?

4

5 João Augusto Franco Leonel<sup>1,2</sup>, Geovanna Vioti<sup>1,2</sup>, Maria Luana Alves<sup>1,2</sup>, Diogo Tiago  
6 da Silva<sup>1,2</sup>, Pedro Armando Meneghesso<sup>1</sup>, Julia Cristina Benassi<sup>1</sup>, Júlio César Pereira  
7 Spada<sup>1,2</sup>, Fredy Galvis-Ovallos<sup>3</sup>, Rodrigo Martins Soares<sup>2,4</sup>, Trícia Maria Ferreira de  
8 Sousa Oliveira<sup>1,2\*</sup>

9

10 <sup>1</sup>Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada, Departamento de Medicina  
11 Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São  
12 Paulo – USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

13

14 <sup>2</sup>Programa de pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses,  
15 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de  
16 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga,  
17 São Paulo, Brasil.

18

19 <sup>3</sup>Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública,  
20 Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.

21

22 <sup>4</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de  
23 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga,  
24 São Paulo, Brasil.

25

26 **\*Autor correspondente:** T. M. F. de S. Oliveira. Departamento de Medicina  
27 Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São  
28 Paulo – USP. Avenida Duque de Caxias Norte, 225, Jardim Elite, CEP: 13635-900,  
29 Pirassununga, São Paulo, Brasil. E-mail: [tricia@usp.br](mailto:tricia@usp.br).

## DESTAQUES

1) Métodos de extração de DNA caseiros ou comerciais foram capazes de extrair DNA de amostras individuais de flebotomíneos.

2) Os métodos de extração caseiros tiveram um desempenho melhor ou pelo menos igual aos métodos comerciais.

3) O método caseiro baseado em *NaCl*/álcool é uma boa opção para extrair DNA de flebotomíneos.

## RESUMO

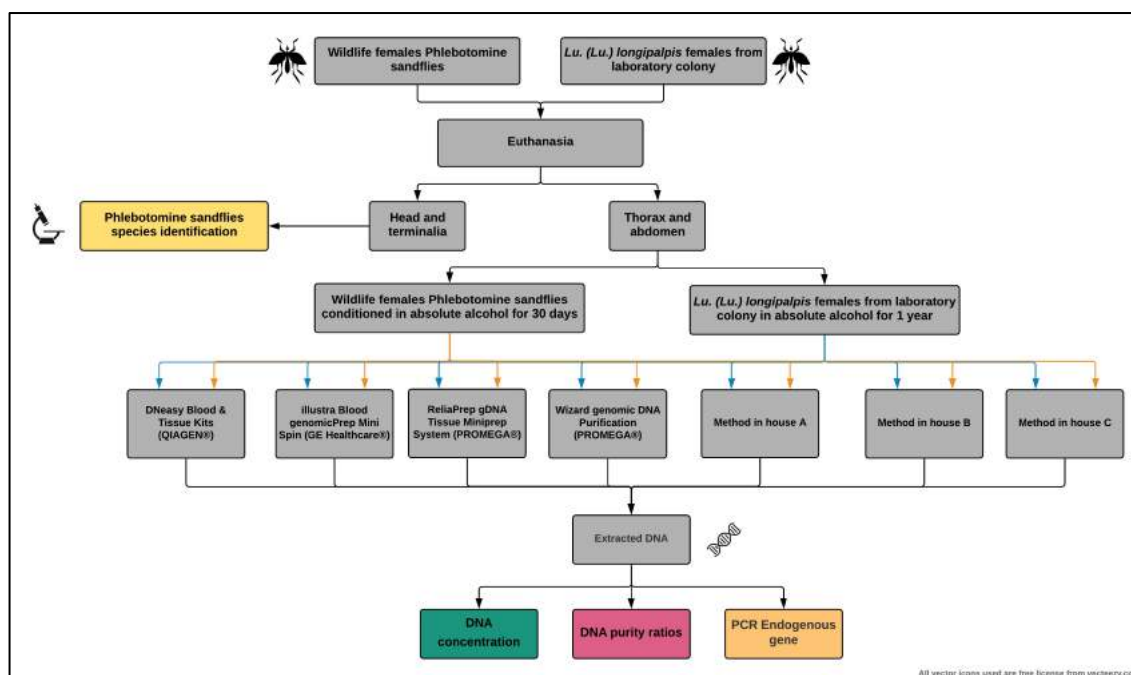
Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são pequenos dípteros com grande importância em ciências médicas e veterinárias. Esse grupo de insetos é intensamente estudado em todo o mundo, por serem vetores conhecidos de vírus, *Bartonella bacilliformis* e principalmente *Leishmania* spp. Atualmente, análises moleculares têm sido incluídas nos estudos desses insetos, mostrando-se serem ferramentas poderosas nos estudos sobre bioecologia desses dípteros. Contudo, quando essas ferramentas são empregadas, há, entre os pesquisadores, uma grande preocupação em relação a quantidade e a qualidade do DNA obtido para essas análises. Nesse trabalho, foram avaliados sete métodos de extração de DNA, entre kits comerciais e protocolos de extração caseiros. Para tal, consideramos as medidas de concentração e razões de pureza do DNA em espectrofotômetro para verificar o desempenho de cada protocolo. Além disso, a avaliação da qualidade do DNA extraído foi realizada pela PCR do gene endógeno de flebotomíneos nas amostras. Os resultados dos sete protocolos de extração de DNA avaliados e suas implicações são discutidos abaixo.

**Palavras-chaves:** Análise molecular; Flebotomíneo; Kit de extração comercial; PCR; Protocolo de extração caseiro; Vetor;

65

## RESUMO GRÁFICO

66



67

68

Fonte: Elaborado pelo autor

69

## INTRODUÇÃO

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

Denominados de "mosquito-palha" devido à coloração pálida ou arenosa (Maroli et al., 2013), os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos pequenos e peludos, com no máximo 3mm de comprimento (Killick-Kendrick, 1999) e com grande relevância médica e veterinária (Dantas-torres et al., 2010). Os flebotomíneos machos e fêmeas se alimentam de fontes naturais de açúcar (Killick-Kendrick, 1999; Schlein e Warburg, 1986). No entanto, as fêmeas também se alimentam de sangue, que fornece nutrição adequada para a produção e maturação dos ovos (Killick-Kendrick, 1999). As fêmeas desses insetos têm hábitos alimentares oportunistas (Barata et al., 2005), podendo se alimentar do sangue de uma grande variedade de hospedeiros, e dessa forma, atuam como vetores de patógenos importantes para humanos e animais (Latrofa et al., 2011). Até o momento, foram descritas aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos, das quais mais de cinquenta por cento ocorrem nas Américas (Shimabukuro et al., 2017). Cerca de 98 espécies são consideradas vetores confirmados ou suspeitos de vírus (Phlebovirus, Vesiculovirus), bactérias (*Bartonella bacilliformis*) e principalmente protozoários (*Leishmania* spp.) (Depaquit et al., 2010; Maroli et al., 2013; Moriconi et al., 2017).

87 São insetos intensamente estudados em todo o mundo com pesquisas que inclui  
88 estudos taxonômicos (Galati et al., 2017), pesquisas entomológicas (Fernandes et al.,  
89 2017), estudos de competência vetorial (Oliveira et al., 2017), estudos de hábitos  
90 alimentares (Fonteles et al., 2018) e pesquisas sobre infecção natural por patógenos  
91 (Fonteles et al., 2018). Nos últimos anos, custo das análises moleculares caiu (Depaquit,  
92 2014). Assim, as ferramentas moleculares começaram a ser incluídas nos estudos de  
93 flebotomíneos, aumentando a sensibilidade e a especificidade na detecção de DNA do  
94 parasita (Paiva et al., 2007) e/ou ajudando na identificação taxonômica desses dípteros  
95 (Casaril et al., 2017).

96

97 Vários métodos de extração de DNA têm sido utilizados em amostras de  
98 flebotomíneos (Caligiuri et al., 2019). Esses protocolos geralmente são baseados em  
99 protocolos caseiros usando fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Michalsky et al., 2002),  
100 ou sais/álcool (Paiva et al., 2007; Galvis-Ovallos et al., 2017) ou ainda kits comerciais  
101 baseados em colunas de sílica (Carvalho et al., 2017; Sales et al., 2015), em soluções  
102 (Rodrigues et al., 2017) ou resina Chelex® (Figueiredo et al., 2016). Em relação à  
103 preservação de amostras de flebotomíneos, os métodos variam entre os grupos de  
104 pesquisa. Esses métodos incluem amostras armazenadas secas a -20 °C (Sales et al.,  
105 2015) ou a -80 °C (Rodrigues et al., 2017), em álcool 70% à temperatura ambiente  
106 (Silva et al., 2008) ou a 4 °C (González et al., 2015), em álcool absoluto à temperatura  
107 ambiente (Ávila et al., 2018), em isopropanol a 4 °C (Paiva et al., 2007) ou a -20 °C  
108 (Rodrigues et al., 2014) ou mesmo com PBS a -80 °C (Michalsky et al., 2002), TE -20  
109 °C (Pita-Pereira et al., 2005) e DMSO 6% em nitrogênio líquido (Michalsky et al.,  
110 2011).

111

112 Como se sabe, para análises moleculares eficientes, é extremamente importante  
113 obter DNA livre de contaminantes e em quantidades suficientes (Oliveira et al., 2007)  
114 fato, que é de grande preocupação em amostras de flebotomíneos que possuem corpos  
115 pequenos constituídos, principalmente, por um exoesqueleto de quitina, que pode atuar  
116 como inibidor de PCR (Casaril et al., 2017; Paiva et al., 2007). Além disso, o processo  
117 de preservação desses insetos, após a captura, é uma importante etapa anterior que deve  
118 ser levada em consideração pelos pesquisadores, a fim de realizar análises moleculares  
119 mais sensíveis e específicas (Paiva et al., 2007). Assim, o objetivo desse trabalho foi  
120 comparar sete métodos de extração de DNA de amostras individuais de fêmeas de

121 flebotomíneos, armazenadas em álcool absoluto por 30 dias ou 1 ano, quanto à  
122 quantidade e qualidade do DNA obtido.

123

## 124 MATERIAL E MÉTODOS

125

### 126 *Amostras de flebotomíneos*

127

128 Em janeiro de 2018, foram realizadas capturas de flebotomíneos utilizando  
129 armadilhas luminosas do tipo CDC no município de Ilha Solteira, estado de São Paulo,  
130 Brasil. Os insetos capturados foram prontamente levados ao laboratório em caixa de  
131 isopor com gelo reciclável. No laboratório, os insetos foram eutanasiados em freezer a -  
132 20 °C por 20 minutos e depois triados. Trinta e cinco fêmeas de flebotomíneos foram  
133 separadas e tiveram suas cabeças e terminálias seccionadas, clarificadas e montadas em  
134 lâminas de vidro (Forattini, 1973) para identificação de espécies de acordo com Galati  
135 (2018) e abreviação de gêneros seguida por Marcondes (2007). O tórax e o abdômen  
136 dessas fêmeas foram preservados, individualmente, em tubos estéreis, com álcool  
137 absoluto (Merck) a -20 °C para extração de DNA após 30 dias.

138

139 Para avaliar os mesmos métodos de extração de DNA para amostras de  
140 flebotomíneos acondicionadas em álcool absoluto por 1 ano, 35 fêmeas de *Lutzomyia*  
141 (*Lutzomyia*) *longipalpis* do Laboratório de Entomologia em Saúde  
142 Pública/Phlebotominae (LESP) da Faculdade de Saúde Pública (FSP), Universidade de  
143 São Paulo (USP). Os insetos foram eutanasiados e processados como descrito acima.  
144 Entretanto, o tórax e o abdômen dessas fêmeas foram acondicionados, individualmente,  
145 em tubos estéreis com álcool absoluto (Merck) a -20 °C para extração de DNA após 1  
146 ano.

147

### 148 *Métodos de extração de DNA*

149

150 Foram avaliados sete métodos de extração de DNA, entre kits comerciais e  
151 protocolos caseiros de extração. Os métodos, protocolos de referência e número de  
152 amostras testadas por cada um deles são apresentados na Tabela 1. Para todos os  
153 métodos, antes de iniciar cada protocolo, as amostras foram centrifugadas a 14.000  
154 RPM por 15 min e o álcool removido com uma pipeta, seguida de uma incubação a 56

155 °C por 15 min. No final de cada método, o DNA foi eluído em 50µL de água ultrapura  
156 autoclavada.

157

#### 158 *Quantificação de DNA*

159

160 O DNA extraído foi quantificado usando um espectrofotômetro (DS-11,  
161 DeNovix®) com base nas recomendações do fabricante. A pureza de cada DNA  
162 extraído foi medida através das razões de absorbância 260/280nm e 260/230nm no  
163 mesmo equipamento (Riemann et al., 2007). Consideramos os valores de 1,8 para a  
164 razão 260/280nm e de 1,8 a 2,2 para a razão de 260/230nm, como padrão para o DNA  
165 puro (Riemann et al., 2007).

166

#### 167 *Avaliação do DNA extraído*

168

169 Para avaliar a qualidade da extração do DNA, foi realizada uma PCR para a  
170 região IVS6 do gene da cacofonia de flebotomíneos, com os iniciadores descritos por  
171 Lins et al. (2002) e de acordo com Pita-Pereira et al. (2005) com modificações. Foram  
172 adicionados 2,5µL de amostras de DNA em 20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5mM  
173 MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTPs, 0,5µM primers e 1U Platinum® Taq DNA polimerase. A  
174 amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®) com ciclo  
175 inicial de desnaturação a 94 °C por 12 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94  
176 °C por 30s, anelamento a 55 °C por 30s e extensão a 72 °C por 30s, com uma extensão  
177 final a 72 °C por 10 min. Amostras de DNA de *Lu. (Lu.) longipalpis* do LESP  
178 (FSP/USP) e água ultrapura autoclavada foram utilizadas como controle positivo e  
179 negativo, respectivamente.

180

181 Os produtos de PCR (12µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose  
182 a 2% corada com DNA Gel Stain SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-Borato-  
183 EDTA (TBE) (pH 8,0) (Invitrogen®). O marcador de peso molecular de 100 pares de  
184 base (pb) (KASVI®) foi utilizado para estimar o tamanho dos amplificadas. Os  
185 produtos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com  
186 a ajuda do fotodocumentador Photo Doc-It (UVP®).

187

188

189



190 *Análises de custos e tempo*

191

192 Foi realizada uma cotação de preços on-line de kits comerciais, reagentes e  
193 materiais utilizados em cada método de extração de DNA. Não consideramos o custo da  
194 mão-de-obra, o equipamento ou o desgaste do equipamento (Caldart et al., 2011).  
195 Devido ao maior rendimento das soluções usadas nos métodos de extração caseiros, em  
196 nossa análise consideramos as quantidades necessárias para realizar 500 extrações por  
197 método. Em relação ao tempo, consideramos as horas e minutos necessários, de acordo  
198 com cada protocolo, para extrair o DNA de 10 amostras (Caldart et al., 2011).

199

200 *Análise estatística*

201

202 A média da concentração de DNA extraído pelos sete diferentes métodos de  
203 extração de DNA foi avaliada por análise de variância (ANOVA) usando o teste F, e as  
204 médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey usando o pacote de dados  
205 "agricolae". Para todos os testes, foram calculados intervalos de confiança de 95% e  
206 valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas  
207 no software estatístico R, versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2014).

208

209 **RESULTADOS**

210

211 *Banco de amostras de DNA de flebotomíneos*

212

213 Foi constituído um banco de amostras de DNA de 35 fêmeas de flebotomíneos  
214 de vida livre capturados no peridomicílio da cidade de Ilha Solteira, estado de São  
215 Paulo. Foram encontradas quatro espécies de flebotomíneos, *Brumptomyia avellari*  
216 (Costa Lima, 1932), *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi* (Ryan, Fraiha, Lainson &  
217 Shaw, 1986), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) e *Lu. (Lu.) longipalpis* (Lutz & Neivai,  
218 1912). O tórax e o abdômen de cada fêmea foram armazenados individualmente em  
219 tubos estéreis contendo álcool absoluto por 30 dias entre a data da captura e a extração  
220 do DNA. Enquanto isso, trinta e cinco fêmeas de *Lu. (Lu.) longipalpis* criadas em  
221 laboratório tiveram seu tórax e abdômen preservados como descrito acima, mas em  
222 álcool absoluto por 1 ano até o momento da extração do DNA.

223

224

225 *Concentração do DNA extraído*

226

227 As concentrações de DNA obtidas por espectrofotômetro em cada método foram  
228 comparadas e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Em relação às amostras de  
229 flebotômicos preservadas por 30 dias, os métodos 3, 6 e 7 apresentaram maior  
230 concentração de DNA ( $p \leq 0,05$ ), sem diferenças observadas entre eles ( $p > 0,05$ ). Os  
231 métodos 1, 2, 4 e 5 apresentaram menor concentração de DNA que os métodos acima  
232 ( $p \leq 0,05$ ), também, sem diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

233

234 Em relação às amostras armazenadas por 1 ano, o método 7 apresentou uma  
235 concentração significativamente maior de DNA, em comparação com os demais  
236 ( $p \leq 0,05$ ), exceto o método 6 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). O método 6 mostrou a segunda maior  
237 concentração, mas não foi significativo quando comparado ao método 1 ( $p > 0,05$ ). Os  
238 métodos 1, 2 e 5 apresentaram concentração decrescente de DNA extraído, mas não  
239 diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). O método 4 mostrou a menor concentração ( $p \leq 0,05$ ), mas  
240 não estatisticamente diferente dos métodos 2, 5, 3 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

241

242 *Pureza do DNA extraído*

243

244 Em relação às razões de pureza 260/280nm e 260/230nm medidas em  
245 espectrofotômetro, os resultados também são apresentados na Tabela 2. Para a razão  
246 260/280nm, as amostras preservadas por 30 dias apresentaram valores próximos ao  
247 ideal para os métodos 2, 5 e 6, mas sem diferença significativa com os demais ( $p > 0,05$ )  
248 (Tabela 2). Em relação à razão 260/230nm, apenas os métodos 1 e 6 apresentaram  
249 valores ideais, mas, não diferiram com os métodos 2, 3, 4 e 7 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). O  
250 método 5 apresentou o pior valor para essa relação, com diferença significativa para os  
251 demais ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 2).

252

253 Sobre as amostras de flebotômicos preservadas por 1 ano, para a razão  
254 260/280nm, os métodos 4 e 7 apresentaram melhores resultados e para a razão  
255 260/230nm, o método 6, porém, novamente, sem diferença significativa em relação a  
256 outros métodos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2)

257

258

259

## 260 *Controle endógeno*

261

262 Para melhor avaliar a qualidade do DNA extraído a partir de cada método de  
263 extração, foi realizada uma PCR para a região IVS6 do gene da cacofonia dos  
264 flebotomíneos e os resultados apresentados na Figura 1. Observamos três padrões no  
265 tamanho das bandas de amplificação nessa PCR. As amostras de DNA do tórax e  
266 abdômen de *Ny. whitmani* e *Ev. (Ald.) carmelinoi* apresentaram uma banda de 220pb, as  
267 amostras de *Lu. (Lu.) longipalpis* (250pb) e *Br. avellari* (350pb) (Figura 1). Todos os  
268 métodos avaliados neste estudo mostraram amplificação para a PCR de gene endógeno  
269 em amostras preservadas por 30 dias (Figura 1A). Quanto as amostras armazenadas por  
270 1 ano, somente o método 4 não apresentou amplificação de DNA (Figura 1B).

271

## 272 *Análises de custos e tempos*

273

274 Os custos e o tempo para extrair DNA de uma amostra de flebotomíneo a partir  
275 de cada método de extração de DNA são apresentados na Tabela 3. Quanto aos custos, o  
276 método 5 apresentou o menor custo por amostra e o método 3, o custo mais alto (Tabela  
277 3). Em relação ao tempo necessário para a extração do DNA em cada método, o método  
278 1 mostrou-se o mais rápido, enquanto o método 6 é o mais demorado (Tabela 3).

279

## 280 **DISCUSSÃO**

281

282 Atualmente, as análises moleculares mostram-se ferramentas poderosas nos  
283 estudos de bioecologia de flebotomíneos, apoiando a caracterização de vetores e não  
284 vetores, a identificação de espécies crípticas ou ainda, a proposição de novas  
285 sistemáticas evolutivas (Casaril et al., 2017; Depaquit, 2014). Dessa forma, uma  
286 quantidade suficiente de DNA de alta qualidade é essencial para a utilização dessas  
287 ferramentas e a seleção de um método apropriado de extração de DNA desempenha um  
288 papel central nesse sentido (Psifidi et al., 2010). Portanto, comparamos sete métodos  
289 diferentes de extração de DNA em amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas  
290 de flebotomíneos, em relação à concentração e pureza do DNA extraído. Nosso objetivo  
291 não foi comparar métodos de preservação de amostras, todas as nossas amostras foram  
292 armazenadas em álcool absoluto a -20 °C. No entanto, verificamos o desempenho de  
293 cada método de extração de DNA em amostras preservadas em duas condições de  
294 tempo (30 dias e 1 ano). Comparamos quatro kits comerciais (três baseados no sistema

295 de colunas de sílica e um no sistema de soluções) e três protocolos caseiros de extração  
296 de DNA (baseados em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, acetato de amônio/álcool e  
297 *NaCl*/álcool) sendo observadas diferenças entre eles ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

298

299 Em relação aos kits comerciais, a extração de DNA usando sistemas de coluna  
300 de sílica se baseia na adsorção do DNA em partículas de sílica na presença de sais  
301 específicos em um pH específico, seguido pelas etapas de lavagem até a eluição do  
302 DNA (Casaril et al., 2017; Yang et al., 1998). Utilizamos três métodos comerciais de  
303 extração de DNA baseados no sistema de coluna de sílica, método 1 (DNeasy Blood &  
304 Tissue Kits, QIAGEN®), método 2 (ilustra Blood genomicPrep Mini Spin, GE  
305 Healthcare®) e método 3 (ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System, PROMEGA®).  
306 Esses métodos foram utilizados em vários estudos moleculares com flebotômíneos  
307 (Carvalho et al., 2017; Casaril et al., 2017; González et al., 2015; Sales et al., 2015). Em  
308 geral, esses métodos foram capazes de extrair DNA de amostras individuais de tórax e  
309 abdômen de fêmeas de flebotômíneos armazenados em álcool absoluto por 30 dias  
310 (Figura 1A) e 1 ano (Figura 1B). No entanto, foram observadas diferenças na  
311 concentração de DNA entre eles (Tabela 2) ( $p < 0,05$ ). O método 3 apresentou a maior  
312 concentração de DNA nas amostras preservadas em álcool absoluto por 30 dias  
313 ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 2). Este método foi testado por Casaril et al. (2017) que o  
314 recomendaram para a obtenção de DNA para métodos moleculares como PCR. Em  
315 relação às amostras armazenadas por 1 ano, o método 1 apresentou a concentração de  
316 DNA mais expressiva ( $p \leq 0,05$ ), embora não diferisse do método 2 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).  
317 Outro kit comercial para extração de DNA utilizado neste trabalho, foi o Wizard  
318 genomic DNA Purification (PROMEGA®) (método 4) baseado sistema de precipitação  
319 de proteínas e do DNA através de soluções (Rodrigues et al., 2017). Este kit de extração  
320 foi utilizado para extrair DNA em amostras de *Bactrocera oleae* com sucesso  
321 (Tsoumani et al., 2013). Até o nosso conhecimento, essa é a primeira vez que esse  
322 método foi aplicado em amostras de flebotômíneos. Contudo, esse método apresentou a  
323 menor concentração de DNA nos dois tempos de preservação em álcool absoluto  
324 ( $p \leq 0,05$ ), embora não tenha diferido dos métodos 1 e 2 (nas amostras de 30 dias) e 2 e 3  
325 (nas amostras de 1 ano) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). Além disso, foi capaz de extrair DNA  
326 apenas em amostras de tórax e abdômen de fêmeas de flebotômíneos armazenados em  
327 álcool absoluto por 30 dias (Figura 1A). Não foi observada amplificação para a PCR de  
328 gene endógeno em amostras armazenadas em álcool absoluto por ano extraídas por esse  
329 mesmo método (Figura 1B).

330 Os métodos caseiros de extração de DNA têm três etapas básicas: lise celular  
331 (com detergentes e/ou proteinase K), desnaturação/precipitação de proteínas (com  
332 solventes orgânicos ou sais) e precipitação de DNA (com álcool). Neste estudo, foram  
333 utilizados três protocolos caseiros que apresentaram diferença nas etapas de  
334 desnaturação/precipitação de proteínas e na precipitação de DNA. O método 5 é  
335 baseado na associação de acetato de amônio/álcool, o método 6, baseado no conjunto  
336 fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e o método 7, baseado em *NaCl*/álcool. Ambos os  
337 métodos 5 e 6 são comumente utilizados em amostras de flebotomíneos (Galvis-Ovallos  
338 et al., 2017; Michalsky et al., 2011). Sobre o método 7, esse protocolo foi utilizado com  
339 sucesso na extração de DNA de amostras de suabe conjuntival de cães e gatos  
340 (Fernandes et al., 2019) e, até nosso conhecimento, é a primeira vez que esse método foi  
341 submetido às amostras de flebotomíneos. Em relação a esses métodos, mesmo em  
342 amostras preservadas em álcool absoluto por 30 dias ou 1 ano, o método 7 apresentou as  
343 maiores concentrações de DNA ( $p \leq 0,05$ ), mas não diferiu do método 6 ( $p > 0,05$ )  
344 (Tabela 2). Ao contrário dos métodos 6 e 7, o método 5 demonstrou menor  
345 concentração de DNA nas duas condições de preservação das amostras ( $p \leq 0,05$ )  
346 (Tabela 2). No entanto, para todos esses três métodos, houve amplificação para a PCR  
347 de gene endógeno em amostras preservadas em álcool absoluto por 30 dias e 1 ano  
348 (Figura 1). Como mencionado anteriormente, o método 6 é baseado em  
349 fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e tem sido utilizado com sucesso em vários estudos  
350 moleculares com flebotomíneos. No entanto, de acordo com Paiva et al. (2007; 2003)  
351 esse método não mostrou boa sensibilidade; além disso, também foi observada perda de  
352 DNA durante o processo de lavagens. Da mesma forma, Arez et al. (2000) observaram  
353 uma possível inibição da PCR pela presença de inibidores no tecido do mosquito  
354 *Anopheles* spp. que aumentou quando protocolos com fenol/clorofórmio/álcool  
355 isoamílico foram empregados. Neste estudo, nenhuma dessas observações foi  
356 verificada. No entanto, deve-se considerar que, em nossa impressão, é um método  
357 tecnicamente mais trabalhoso, principalmente porque utiliza fenol, uma substância  
358 altamente tóxica (Psifidi et al., 2015). Assim, o método 7 pode ser uma boa e segura  
359 segunda opção para extrair DNA de flebotomíneos.

360

361 Nesse trabalho, testamos vários protocolos que exigem em algum momento, o  
362 uso de solventes orgânicos, sais ou guanidina (kits comerciais), todas essas substâncias  
363 podem inibir a amplificação por PCR (Salonen et al., 2010). Além disso, a composição  
364 proteica do corpo dos insetos pode atuar como inibidores da PCR (Casaril et al., 2017;

365 Paiva et al., 2007). Assim, as razões de absorvância a 260/280nm e 260/230nm, foram  
366 utilizadas como critérios para a aferir a qualidade do DNA extraído a partir de cada  
367 método (Psifidi et al., 2010; 2015). Independentemente, dos tempos de preservação da  
368 amostra em álcool absoluto para métodos comerciais ou caseiros, não houve diferença  
369 significativa na razão 260/280nm ( $p>0,05$ ), usada para avaliar a contaminação por  
370 proteínas e solventes orgânicos (Psifidi et al., 2015). A razão de 260/230nm pode  
371 indicar contaminação com *NaCl* e/ou guanidina (usada nas etapas de lavagem dos  
372 métodos comerciais baseados em colunas de sílica) (Psifidi et al., 2010). Apenas o  
373 método 5 mostrou um valor significativamente ruim para essa razão em comparação  
374 com outros métodos, mas apenas em amostras preservadas em álcool absoluto por 30  
375 dias (Tabela 2) ( $p\leq 0,05$ ). Mesmo que houvesse uma possível contaminação com *NaCl*  
376 nesse método, ainda não foi capaz de inibir a PCR para o gene endógeno (Figura 1).

377

378 Analisando métodos de extração de DNA comerciais *versus* caseiros, todos  
379 foram capazes de extrair DNA de amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas  
380 de flebotômicos, sejam acondicionados em álcool absoluto por 30 dias ou 1 ano  
381 (Figura 1). No entanto, algumas observações devem ser pontuadas. Em geral, seja nas  
382 amostras por 30 dias ou 1 ano, os métodos caseiros tiveram um desempenho melhor ou,  
383 pelo menos, igual aos métodos comerciais. Por exemplo, o método 6 mostrou melhores  
384 valores para concentração de DNA e razões de pureza do que outros métodos  
385 comerciais. Os kits comerciais têm a vantagem de realizar uma extração rápida e  
386 simples de DNA (Casaril et al., 2017; Psifidi et al., 2015). Sem dúvida, em nossos  
387 testes, esses métodos mostraram maior agilidade e simplicidade (Tabela 3). No entanto,  
388 eles oferecem extrações a um custo mais alto por amostra (Tabela 3). A partir de nossos  
389 resultados, não observamos outras vantagens do uso de kits comerciais em comparação  
390 com os protocolos caseiros de extração de DNA. Embora os métodos caseiros exijam  
391 mais tempo, custam menos e oferecem DNA em boa quantidade e qualidade (Tabela 3).  
392 Em particular, o método 6 (a base de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico) ou o método  
393 7 (a base de *NaCl*/álcool) são uma boa opção para extrair DNA amostras individuais de  
394 tórax e abdômen de fêmeas de flebotômicos.

395

396 Embora a escolha de um método de extração de DNA apropriado tenha um  
397 papel importante no sucesso de estudos moleculares (Psifidi et al., 2015), há poucos  
398 estudos que avaliam os procedimentos de extração de DNA genômico em amostras de  
399 flebotômicos (Casaril et al., 2017; Paiva et al., 2003). Nossos resultados mostraram

400 que, dependendo do tempo em álcool absoluto a -20 °C, os métodos comerciais 1, 2 e 3  
401 são uma boa opção para extração de DNA de flebotomíneos. No entanto, os métodos  
402 caseiros 6 e 7 apresentaram melhores resultados, independentemente, do tempo de  
403 preservação das amostras. O método ideal deve ser simples, rápido, seguro e econômico  
404 (Lahiri e Schnabel, 1993) e gerar o mínimo de resíduos tóxicos (Steiner et al., 1995).  
405 Assim, acreditamos que o método 7 é a melhor escolha para extrair DNA de amostras  
406 individuais de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos conservadas em álcool  
407 absoluto por até 1 ano. Nesse trabalho, não objetivamos padronizar métodos de  
408 preservação de amostras ou de extração de DNA de flebotomíneos. Nossos resultados  
409 pretendem servir de referência para apoiar a escolha do método de extração de DNA,  
410 mais adequado a realidade de outros grupos de pesquisa, em estudos moleculares de  
411 flebotomíneos.

412

### 413 **CONCLUSÃO**

414

415 Nossos resultados demonstram que os métodos comerciais 1, 2 e 3 são uma boa  
416 opção para extrair DNA de amostras de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos,  
417 mas o tempo em álcool absoluto deve ser considerado. Entretanto, os métodos caseiros  
418 6 e 7 apresentaram melhores resultados, independentemente do tempo de preservação  
419 das amostras em álcool absoluto.

420

### 421 **DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

422

423 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da  
424 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-  
425 USP) sob o número de registro CEUA 3005290817.

426

### 427 **FINANCIAMENTO**

428

429 Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do  
430 Estado de São Paulo (FAPESP), projeto número 2017/23436-0 e da Coordenação de  
431 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de  
432 Financiamento 001.

433

434

435           **CONFLITO DE INTERESSES**

436

437           Os autores declaram que não há conflito de interesses.

438

439           **AGRADECIMENTOS**

440

441           Gostaríamos de agradecer a Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati pelos

442 ensinamentos e ajuda na identificação de espécies de flebotomíneos, e pelo

443 fornecimento das fêmeas de *Lu. Lu. longipalpis* criadas no LESP-FSP/USP.

444



445 **TABELAS**

446

447 **Tabela 1.** Métodos de extração de DNA e protocolos de referência utilizados para obter DNA de amostras individuais de tórax e abdômen de  
 448 fêmeas de flebotomíneos preservadas em álcool absoluto a -20 °C por 30 dias e 1 ano.

Número do método	Método de extração de DNA	Tipo de método	Protocolo	Amostras (álcool absoluto por 30 dias)	Amostras (álcool absoluto por 1 ano)	Número de amostras
<b>Método 1</b>	DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN®)	Comercial	Instruções do fabricante	5	5	10
<b>Método 2</b>	illustra Blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare®)	Comercial	Instruções do fabricante	5	5	10
<b>Método 3</b>	ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (PROMEGA®)	Comercial	Instruções do fabricante	5	5	10
<b>Método 4</b>	Wizard genomic DNA Purification (PROMEGA®)	Comercial	Instruções do fabricante	5	5	10
<b>Método 5</b>	Método caseiro A	Caseiro	Bruford et al. (1998) com modificações de Galvis-Ovallos et al. (2017)	5	5	10
<b>Método 6</b>	Método caseiro B	Caseiro	Michalsky et al. (2002)	5	5	10
<b>Método 7</b>	Método caseiro C	Caseiro	John et al. (1991) com modificações de Lahiri and Nurnberger Jr. (1991)	5	5	10

449 Fonte: Elaborado pelo autor.

450

451

452 **Tabela 2.** Desempenho dos sete métodos de extração de DNA a partir de amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos  
 453 preservadas em álcool absoluto a -20 °C por 30 dias e 1 ano.

Método de extração de DNA	Álcool absoluto por 30 dias					Álcool absoluto por 1 ano				
	Número de amostras	Concentração de DNA (ng/μL)	Razão A260/A280nm	Razão A260/A230nm	PCR de gene endógeno*	Número de amostras	Concentração de DNA (ng/μL)	Razão A260/A280nm	Razão A260/A230nm	PCR de gene endógeno*
<b>Método 1</b>	5	1,934 <sup>b</sup>	2,461 <sup>a</sup>	2,067 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	3,759 <sup>bc</sup>	1,553 <sup>a</sup>	0,453 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>
<b>Método 2</b>	5	2,485 <sup>b</sup>	1,731 <sup>a</sup>	1,042 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	2,291 <sup>cd</sup>	1,661 <sup>a</sup>	0,482 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>
<b>Método 3</b>	5	4,950 <sup>a</sup>	2,197 <sup>a</sup>	1,388 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	1,406 <sup>d</sup>	0,527 <sup>a</sup>	0,655 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>
<b>Método 4</b>	5	1,109 <sup>b</sup>	1,501 <sup>a</sup>	0,465 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	0,754 <sup>d</sup>	1,868 <sup>a</sup>	-0,659 <sup>a</sup>	Negativo <sup>b</sup>
<b>Método 5</b>	5	2,089 <sup>b</sup>	1,782 <sup>a</sup>	-2,209 <sup>b</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	2,274 <sup>cd</sup>	2,034 <sup>a</sup>	-0,597 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>
<b>Método 6</b>	5	4,732 <sup>a</sup>	1,747 <sup>a</sup>	2,045 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	5,436 <sup>ab</sup>	1,621 <sup>a</sup>	1,961 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>
<b>Método 7</b>	5	4,855 <sup>a</sup>	1,523 <sup>a</sup>	0,716 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>	5	6,839 <sup>a</sup>	1,819 <sup>a</sup>	1,045 <sup>a</sup>	Positivo <sup>a</sup>

454 Nota: Letras minúsculas diferentes (a / b / c) indicam diferença estatística com 95% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). \*PCR para a região IVS6 do gene da cacofonia de  
 455 flebotomíneos.

456 Fonte: Elaborado pelo autor.

457

458

459 **Tabela 3.** Análise de custo e tempo dos métodos de extração de DNA usados para processar amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas  
 460 de flebotomíneos.

Número do método	Método de extração de DNA	Custo / amostra (US\$)*	Tempo**
<b>Método 1</b>	DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN®)	\$ 2,91	3h 19min
<b>Método 2</b>	illustra Blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare®)	\$ 2,18	3h 20min
<b>Método 3</b>	ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (PROMEGA®)	\$ 4,05	3h 21min
<b>Método 4</b>	Wizard genomic DNA Purification (PROMEGA®)	\$ 2,31	13h 10min
<b>Método 5</b>	Método caseiro A	\$ 0,58	13h 55min
<b>Método 6</b>	Método caseiro B	\$ 0,89	25h 40min
<b>Método 7</b>	Método caseiro C	\$ 0,59	25h 25min

471 Nota: \*Os custos foram estimados com base em kits comerciais, reagentes e preços de materiais, necessários para processar 500 amostras, de acordo com cada protocolo; \*\*  
 472 Tempo requerido para processar 10 amostras.

473 Fonte: Elaborado pelo autor.

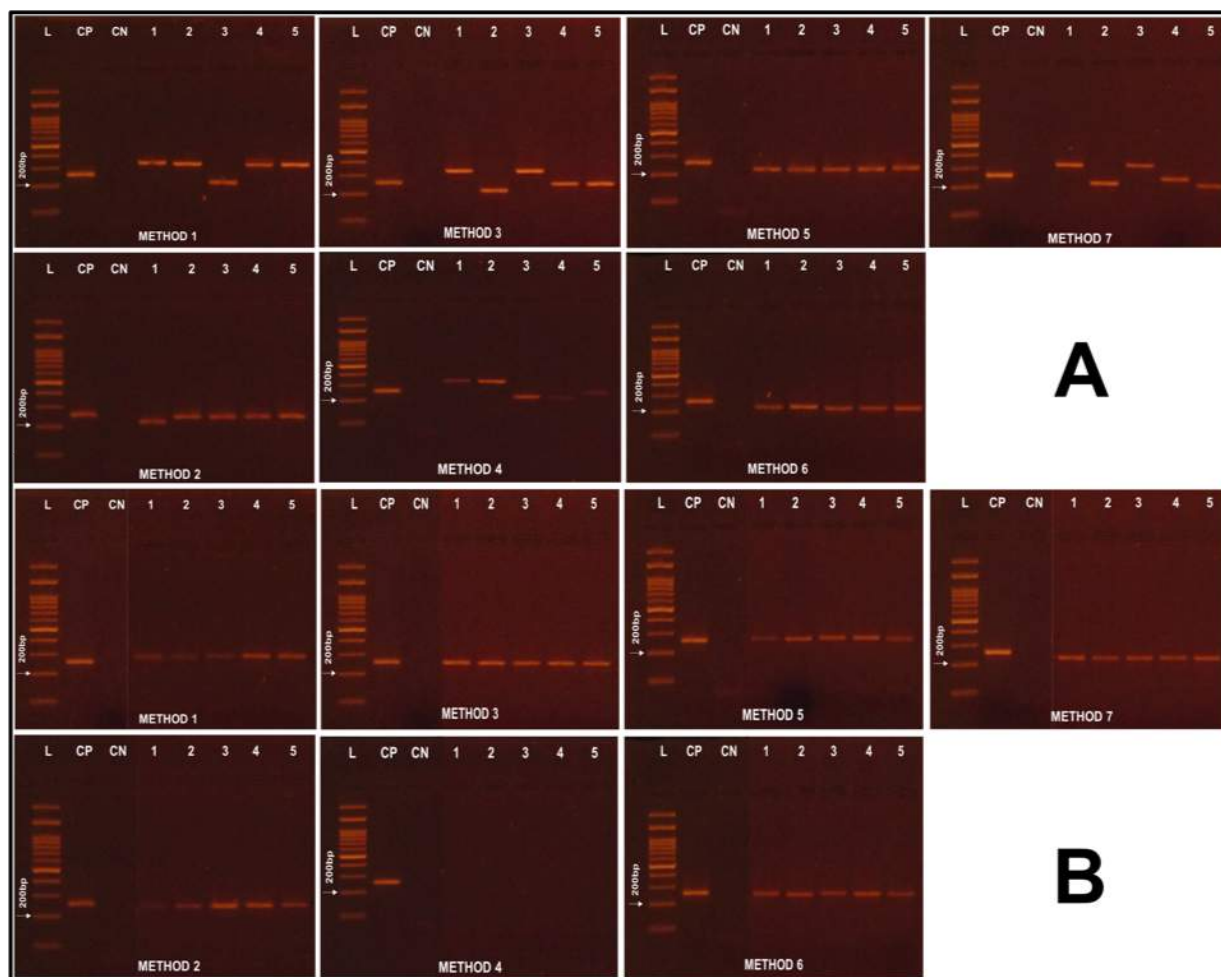
474

## FIGURAS

475

**Figura 1.** Amplificação por PCR da região IVS6 do gene da cacofonia de flebotomíneos em amostras individuais de DNA de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos preservadas em álcool absoluto a -20 °C por 30 dias (A) e 1 ano (B), extraído por sete métodos de extração de DNA (1-7).

478



479

Fonte: Elaborado pelo autor.

480

Legenda: gel de eletroforese em agarose a 2% para o gene da cacofonia (250pb) em amostras individuais de DNA de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos capturadas (1-5) preservados em álcool absoluto a -20 °C por 30 dias (A) e amostras de DNA de tórax e abdômen de fêmeas de *Lu. (Lu.) longipalpis* (1-5) preservada em álcool absoluto a -20 °C por 1 ano (B); com marcador de peso molecular de 100pb (KASVI) (L), DNA de *Lu. (Lu.) longipalpis* (controle positivo) (CP), água ultrapura (controle negativo) (CN).

485

486

487

488

489

490

491

492           **REFERÊNCIAS**

493

494   Arez, A.P., Lopes, D., Pinto, J., Franco, A.S., Snounou, G., Do Rosário, V.E., 2000.  
495       *Plasmodium* sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from  
496       mosquito (*Anopheles* sp.) samples. **Exp. Parasitol.** 94, 269–272.  
497       <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4496>

498   Ávila, M.M., Brilhante, A.F., de Souza, C.F., Bevilacqua, P.D., Galati, E.A.B., Brazil, R.P.,  
499       2018. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of Phlebotomine sand  
500       flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the  
501       municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasit. Vectors** 11, 64.  
502       <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y>

503   Barata, R., França-Silva, J.C., Mayrink, W., Costa Da Silva, J., Prata, A., Seixas Lorosa, E.,  
504       Araújo Fiúza, J., Macedo Gonçalves, C., De Paula, K.M., Santos Dias, E., 2005.  
505       Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de  
506       leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38, 421–425.

507   Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T., 1998. Multilocus and singlelocus  
508       DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R., editor. Multilocus and singlelocus DNA  
509       fingerprinting. 2nd ed. Oxford: IRL Press, p. 287–336.

510   Caldart E.T., Chiappetta, C.M., Lopes, E.F., Ravazzolo, A.P. 2011. Análise comparativa de  
511       métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos  
512       ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae.** 39(1): 945.

513   Caligiuri, L.G., Sandoval, A.E., Miranda, J.C., Pessoa, F.A., Santini, M.S., Salomón, O.D.,  
514       Secundino, N.F.C., McCarthy, C.B., 2019. Optimization of DNA Extraction from  
515       Individual Sand Flies for PCR Amplification. **Methods Protoc.** 2, 36.  
516       <https://doi.org/10.3390/mps2020036>

517   Carvalho, G.M.L., Rêgo, F.D., Tanure, A., Silva, A.C.P., Dias, T.A., Paz, G.F., Andrade  
518       Filho, J.D., 2017. Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa  
519       Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. **J. Med. Entomol.** 54, 1049–1054.  
520       <https://doi.org/10.1093/jme/tjx051>

521   Casaril, A.E., de Oliveira, L.P., Alonso, D.P., Oliveira, E.F., Gomes Barrios, S.P., de Oliveira  
522       Moura Infran, J., Fernandes, W. de S., Oshiro, E.T., Ferreira, A.M.T., Ribolla, P.E.M.,

- 523 de Oliveira, A.G., 2017. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application  
524 to genotyping by next generation sequencing. **Exp. Parasitol.** 177, 66–72.  
525 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.010>
- 526 Dantas-Torres, F., Andrade, A.J. De, Emanuela, K., Tenório, R., Dilermando, J., 2010.  
527 Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of  
528 Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 43, 733–736.
- 529 Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and  
530 perspectives. **Infect. Genet. Evol.** 28, 744–756.  
531 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.027>
- 532 Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P.E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne  
533 viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Euro Surveill.** 15,  
534 19507.
- 535 Fernandes, M.A., Leonel, J.A.F., Isaac, J.A., Benassi, J.C., Keid, L.B., Soares, R.M., Maria,  
536 T., Sousa, F. De, 2019. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to  
537 clinical stages of leishmaniasis in dog. **Braz. J. Vet. Parasitol.** 2961, 194–202.
- 538 Fernandes, W. de S., Borges, L.M., Casaril, A.E., de Oliveira, E.F., Infran, J. de O.M.,  
539 Piranda, E.M., Oshiro, E.T., Gomes, S.P., Oliveira, A.G. de, 2017. Sandfly fauna  
540 (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**  
541 **Sao Paulo** 59, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759054>
- 542 Figueiredo, H.R., Santos, M.F. da C., Casaril, A.E., Infran, J.O. de M., Ribeiro, L.M.,  
543 Fernandes, C.E. dos S., de Oliveira, A.G., 2016. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in an  
544 endemic area of leishmaniasis in Aquidauana municipality, Pantanal of Mato Grosso do  
545 Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 58. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658087>
- 547 Fonteles, R.S., Filho, A.A.P., Moraes, J.L.P., Pereira, S.R.F., Rodrigues, B.L., Rebêlo,  
548 J.M.M., 2018. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification in sand flies  
549 (Diptera: Psychodidae) from Lençóis Maranhenses national park region, Brazil. **J. Med.**  
550 **Entomol.** 55, 445–451. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx230>
- 551 Forattini, O.P., 1973. **Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses,**  
552 4th ed. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo.

- 553 Galati, E.A.B., 2018. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera:**  
554 **Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas.** Vol I. Faculdade  
555 de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 556 Galati, E.A.B., Galvis-Ovallos, F., Lawyer, P., Léger, N., Depaquit, J., 2017. An illustrated  
557 guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera,  
558 Psychodidae). **Parasite** 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017027>
- 559 Galvis-Ovallos, F., Casanova, C., Sevá, A. da P., Galati, E.A.B., 2017. Ecological parameters  
560 of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis* complex in a  
561 visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. **Parasites and Vectors** 10, 1–9.  
562 <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2211-8>
- 563 González, E., Gállego, M., Molina, R., Abras, A., Magdalena, M., Ballart, C., Fernández, A.,  
564 Jiménez, M., 2015. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-  
565 RFLP approach based on cytochrome b gene. **Acta Trop.** 152, 96–102.  
566 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>
- 567 John, S.W., Weitzner, G., Rozen, R., Scriver, C.R., 1991. A rapid procedure for extracting  
568 genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Res.** 19, 408.  
569 <https://doi.org/10.1093/nar/19.2.408>
- 570 Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clin.**  
571 **Dermatol.** 17, 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- 572 Lahiri, D.K., Nurnberger Jr., J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of  
573 HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.** 19, 5444.  
574 <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- 575 Lahiri, D.K., Schnabel, B., 1993. DNA isolation by a rapid method from human blood  
576 samples: Effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and  
577 quality. **Biochem. Genet.** 31, 321–328. <https://doi.org/10.1007/BF00553174>
- 578 Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V.D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto,  
579 D., 2011. Multilocus molecular and phylogenetic analysis of Phlebotomine sand flies  
580 (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. **Acta Trop.** 119, 91–98.  
581 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.013>
- 582 Lins, R.M., Oliveira, S.G., Souza, N.A., de Queiroz, R.G., Justiniano, S.C., Ward, R.D.,

- 583 Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region  
584 in sandflies. **Insect Mol. Biol.** 11, 117–122.
- 585 Marcondes, C.B., 2007. a Proposal of Generic and Subgeneric Abbreviations for  
586 Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. **Entomol.**  
587 **News** 118, 351–356. [https://doi.org/10.3157/0013-872x\(2007\)118\[351:apogas\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3157/0013-872x(2007)118[351:apogas]2.0.co;2)
- 588 Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine  
589 sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.  
590 **Med. Vet. Entomol.** 27, 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- 591 Michalsky, E.M., de Sena Guedes, K., de Oliveira Lara Silva, F., França-Silva, J.C., Dias,  
592 C.L.F., Barata, R.A., Dias, E.S., Barata, R.A., Dias, E.S., 2011. Infecção natural de  
593 *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum*  
594 *chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, estado de Minas Gerais,  
595 Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 44, 58–62.
- 596 Michalsky, E.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., Dias, E.S., 2002.  
597 Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected  
598 individual Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst.**  
599 **Med. Trop. Sao Paulo** 44, 255–259. [https://doi.org/10.1590/S0036-](https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000500004)  
600 [46652002000500004](https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000500004)
- 601 Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., Albieri, A., Angelini, P., Cagarelli, R.,  
602 Landini, M.P., Charrel, R.N., Varani, S., 2017. Phlebotomine sand fly-borne pathogens  
603 in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. **PLoS**  
604 **Negl. Trop. Dis.** 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005660>
- 605 Oliveira, M.C.D.S., Regitano, L.C.D.A., Roese, A.D., Anthonisen, D.G., Patocínio, E.,  
606 Parma, Scagliusi, S.M.M., Timóteo, W.H.B., Jardim, S.N., 2007. Fundamentos teórico-  
607 práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de  
608 reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste** 43.
- 609 Oliveira, E.F., Oshiro, E.T., Fernandes, W.S., Ferreira, A.M.T., De Oliveira, A.G., Galati,  
610 E.A.B., 2017. Vector competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for  
611 *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med.**  
612 **Hyg.** 96, 178–181. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0191>
- 613 Paiva, B.R., Savani, E.S.M.M., Galati, E.A.B., Andrade Jr., H.F., 2003. Comparison of DNA



- 614 extraction procedures for *Leishmania* PCR from stored sandflies. **Rev Inst Med Trop**  
615 45, 170.
- 616 Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Andrade, H.F., Malafronte,  
617 R.D.S., 2007. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA  
618 in sand flies (Diptera, Psychodidae). **Cad. Saude Publica** 23, 87–94.
- 619 Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, Á.L., de Figueiredo Barbosa,  
620 A., Britto, C.C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and  
621 *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil)  
622 revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans. R. Soc. Trop.**  
623 **Med. Hyg.** 99, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>
- 624 Psifidi, A., Dovas, C.I., Banos, G., 2010. A comparison of six methods for genomic DNA  
625 extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples.  
626 **Mol. Cell. Probes.** 24, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.11.001>
- 627 Psifidi, A., Dovas, C.I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C.L., Arsenos, G., Banos, G., 2015.  
628 Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale  
629 whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. **PLoS One**  
630 10, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115960>
- 631 R Development Core Team. R, 2014: A language and environment for statistical computing.  
632 [Internet]. R Foundation for Statistical Computing. Available from: [http://www.r-](http://www.r-project.org)  
633 [project.org](http://www.r-project.org)
- 634 Riemann, K., Adamzik, M., Frauenrath, S., Egensperger, R., 2007. Comparison of Manual  
635 and Automated Nucleic Acid Extraction From Whole-Blood Samples. **J. Clin. Lab.**  
636 **Anal.** 21, 244–248.
- 637 Rodrigues, A.C.M., Magalhães, R.D., Romcy, K.A.M., Freitas, J.L.S., Melo, A.C.F.L.,  
638 Rodon, F.C.M., Bevilaqua, C.M.L., Melo, L.M., 2017. A new whole mitochondrial  
639 genome qPCR (WMG-qPCR) with SYBR Green® to identify Phlebotomine sand fly  
640 blood meals. **Vet. Parasitol.** 238, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.007>
- 641 Rodrigues, A.C.M., Silva, R.A., Melo, L.M., Luciano, M.C.S., Bevilaqua, C.M.L., 2014.  
642 Epidemiological survey of *Lutzomyia longipalpis* infected by *Leishmania infantum* in an  
643 endemic area of Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Veterinária** 23, 55–62.  
644 <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014007>

- 645 Sales, K.G.D.S., Costa, P.L., De Moraes, R.C.S., Otranto, D., Brandão-Filho, S.P., Cavalcanti,  
646 M.D.P., Dantas-Torres, F., 2015. Identification of Phlebotomine sand fly blood meals by  
647 real-time PCR. **Parasites and Vectors** 8, 4–9. [https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3)  
648 3
- 649 Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M.,  
650 Kekkonen, R.A., Palva, A., de Vos, W.M., 2010. Comparative analysis of fecal DNA  
651 extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and  
652 archaeal DNA using mechanical cell lysis. **J. Microbiol. Methods** 81, 127–134.  
653 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.007>
- 654 Schlein, Y., Warburg, A., 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi*  
655 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **J. Med. Entomol.** 23, 11–15.  
656 <https://doi.org/10.1093/jmedent/23.1.11>
- 657 Shimabukuro, P.H.F., De Andrade, A.J., Galati, E.A.B., 2017. Checklist of American sand  
658 flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, species, and their distribution.  
659 **Zookeys** 2017, 67–106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
- 660 Silva, E.A., Andreotti, R., Dias, E.S., Barros, J.C., Brazuna, J.C.M., 2008. Detection of  
661 *Leishmania* DNA in Phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul,  
662 Brazil. **Exp. Parasitol.** 119, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.011>
- 663 Steiner, J.J., Polemba, C.J., Fjellstrom, R.G., Elliott, L.F., 1995. A rapid one-tube genomic  
664 DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Res.** 23, 2569–  
665 2570. <https://doi.org/10.1093/nar/23.13.2569-a>
- 666 Tsoumani, K.T., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P., Mathiopoulos, K.D., 2013.  
667 Molecular characterization and chromosomal distribution of a species-specific  
668 transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. **PLoS**  
669 **One** 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079393>
- 670 Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C., Saunders, S.R., 1998. Technical Note:  
671 Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns  
672 **American Journal of Physical Anthropology** 543, 539–543.
- 673

## 6. CONCLUSÃO

Esse trabalho gerou resultados que estão aqui apresentados sobre a forma de dois artigos científicos submetidos para apreciação em revistas internacionais.

Durante dezoito meses foi realizado um inquérito entomológico nas cidades de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo, Brasil. Ambas as cidades são importantes áreas endêmicas de LT e LV no estado. Na área estudada foram encontradas doze espécies de flebotomíneos dentre elas, vetores comprovados ou suspeitos nos ciclos epidemiológicos de LT e LV. Não foram observados padrões sazonais na fauna desses dípteros devido a influência de fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade.

Quanto à obtenção de DNA de flebotomíneos para as análises moleculares, os resultados demonstram que os métodos comerciais de extração são uma boa opção para extrair DNA de amostras individuais de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos. Contudo para esses métodos, o tempo de conservação em álcool absoluto deve ser considerado. Por sua vez, os métodos caseiros baseado em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ou *NaCl*/álcool apresentaram melhores resultados, independentemente do tempo de preservação das amostras em álcool absoluto.

As análises moleculares de PCR para o kDNA de *Leishmania* spp. revelaram uma fêmea não ingurgitada de *Ev. (Ald.) carmelinoi* positiva no peridomicílio em zona rural da cidade de Andradina. Não observamos fêmeas de flebotomíneos positivas para o kDNA de *Leishmania* spp. na cidade de Ilha Solteira.

A identificação de fontes de repasto sanguíneo por PCR para o gene CYT-B de vertebrados revelou suínos, humanos, cães, bovinos, galinhas e gambás como hospedeiros de flebotomíneos, servindo como fonte de alimentação sanguínea para maturação dos ovos das fêmeas desses insetos, na cidade de Ilha Solteira. Não foram identificados hábitos alimentares nas fêmeas de flebotomíneos capturadas em Andradina.

Os resultados podem contribuir com informações relevantes sobre os aspectos bioecológicos de flebotomíneos na área estudada. Dessa forma, contribuir com maior conhecimento sobre a complexa epidemiologia das leishmanioses e embasar medidas de vigilância e controle adequadas na região estudada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 79-86, 2009.

AFONSO, M.; ALVES-PIRES, C. Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In: Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). **Leishmaniose Canina**. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., p.27-40, 2008.

AGUIAR, A. M.; SOUCASAUX T. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I- Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 79: 179-209, 1984.

AKHOUNDI, M. **et al.** *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol Aspects Med**. Outubro, v. 57, p. 1-29, 2017

AKHOUNDI, M. **et al.** A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**. 10(3): e0004349, 2016.

ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 706-17. 1991.

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 14, p. 109-122, 2000.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 17, p. 1–18, 2003.

ALMEIDA, P. S. de. **et al.** Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. Uberaba, v. 43, n. 6, p. 723-727, 2010.

ALVAR, J.; VELEZ, I.D.; BERN, C.; **et al.** Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v.7, p.1-12, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.** v. 22 (12), p. 552-7, 2006.

ANDRADE FILHO, J. D. **et al.** Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 34, p. 323-329, 2001.

ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl Environ Microbiol.** v.66, p.1933-1938. 2000.

ARIAS, J. R. **et al.** The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 75, p. 537–541, 1981.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clin. Dermatol.** v. 14, p. 523–532, 1996.

ÁVILA, M. M. **et al.** Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasit Vectors.** v. 11 (1), p. 64, 2018.

AZEREDO-COUTINHO, R. B. **et al.** First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 101(7), p.735-737, 2007

BARATA, R. A. **et al.** Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 99, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A. **et al.** Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARRETO, M. P. **Observações sobre a biologia, em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo (Díptera, Psychodidae).** 1943. 162f. Tese de livre docência – Fac. Med. Univ. São Paulo, São Paulo, 1943.

BASANO, A. S.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, nº 3, 2004.

BATES, P.A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.** v. 4, p. 601–609, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology.** v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BAUM, M. **et al.** Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica.** v. 143, p. 8-12, 2015.

BENASSI, J. C. **et al.** Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology.** v. 177, p. 93-97, 2017.

BENASSI, J. C. **et al.** Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 38, n. 6, p. 1058-1063, 2018.

BEZERRA-VASCONCELOS, D.R. **et al.** Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology.** v.129, p. 234–239, 2011.

BRANDÃO-FILHO, S. P. **et al.** Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 97, p. 291–296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – 2007 a 2018 - São Paulo.** Brasília. 2019a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgiexe?sinannet/cnv/ltaspdef>. Acessado em: 25 de jun de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - 2007 a 2018 - São Paulo.** Brasília. 2019b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgiexe?sinannet/cnv/leishvspdef>. Acessado em: 25 de jun de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL B. G. Biologia de flebotomíneos do Brasil, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 4, p.257-274, 2003.

BRETAS, J. A. C. **Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae).** 2016. 55 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2016.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo.** 225f. 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo Brasil. São Paulo, 2004.

CÁRDENAS, R. **et al.** Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in Bolivia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 75, p. 273±237, 2006.

CARDIM, M. F. M. **et al.** Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Rev. Saúde Publica.** v. 50, p. 48, 2016.

CARDIM, M. F. M. **et al.** Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no Estado de São Paulo, 1999-2011. **Rev Saúde Pública.** v. 47, n. 4, p. 691-700, 2013.

CARVALHO, G. M. L. **et al.** Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil, using the Cytochrome b PCR method. **Journal of Medical Entomology.** v. 54, n. 4, p. 1049–1054. 2017.

CASANOVA, C. **et al.** Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 7, p. 9, 2013.

CASANOVA, C. **et al.** Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 9, p. 3, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Parasites – Leishmaniasis: Biology. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acessado em 09 de agosto de 2019.

CERBINO-NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública.** v. 25, n. 7, p. 1543-1551, 2009.

CHAGAS, E. **et al.** Leishmaniose visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 32, n. 3, p. 321-480, 1937.

CHAVES, L.F. **et al.** Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. **Trends Parasitol.** v. 23, p. 311–316, 2007.

CONDINO, M. L. F. **et al.** Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 31, p. 355-360, 1998.



COURTENAY, O. **et al.** Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 90, p. 498–502, 1996.

COUTINHO, J. O.; BARRETO, M. P. Dados bionômicos sobre o *Phlebotomus fischeri* Pinto, 1926 (Diptera, Psychodidae). **Rev. Brasil. Biol.** v. 1, p. 423-9, 1941.

CRANSTON, P. Biogeographic patterns in the evolution of Diptera. In The evolutionary biology of flies. **Columbia University Press.** New York, p. 274-311, 2005.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. **Nota prévia.** Hospital, v. 11, n. 2, p. 3-9, 1937.

CUNHA, R. C. **et al.** Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology.** v. 23, p.269–273. 2014.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em áreas endêmicas de Calazar, no Ceará. **Hospital.** v. 48, p. 79-98, 1955a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em zona edêmica do Estado do Ceará, I – Distribuição, predominância e variação estacional. **Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.** v. 21, p. 715-728. 1955b.

DE BRUIJN, M. H.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica.** v. 52, p. 45-58. 1992.

DEDET, J. P.; GAY, F.; CHATENAY, G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 83, p. 613-615, 1989.

DEPAQUIT, J. **et al.** Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Euro Surveill.** v. 15, p. 19507, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

DIAS, E. S. **et al.** Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 49-52, Fev. 2007.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**. v. 5, p. 276, 2012.

DUARTE, I. R. M. **et al.** Comportamento Biológico de *Leishmania (L.) amazonenses* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v.39, n.1, p.33-40, 2010.

DUNAISKY, M. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?** 50f, 2006. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FIGUEIREDO, F. B. **et al.** First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 102, p. 200–201, 2008.

FIGUEIREDO, H. R. **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Aquidauana, área endêmica para leishmaniose visceral, pantanal sul-matogrossense, Brasil.** 128f, 2016. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2016.

FORATTINI, O. P. Algumas observações sobre a biologia de flebotomos (Díptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). **Arquiv. Fac. Hig. Saúde Púb.** v. 8, p. 15-136, 1954.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose. São Paulo: **Editora Edgard Blücher Ltda**; v.4. 658p, 1974.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. G. B.; RABELLO, E.X. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de Leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Rev Saúde Pública.** v. 6, p. 431-3, 1972.

FREITAS, T. P. **et al.** Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v. 12, p. 81–83, 2012.

GALATI, E. A. B. **et al.** An illustrated guide for characteristic and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite.** v. 24, n. 26, 2017.

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

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil.** Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 53-175, 2003b.

GALATI E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I.** 132p, 2018. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.

GALATI E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. **Boletín de la Dirección de Malariología y Ambiental.** v. 35, p. 133–142, 1995.

GALATI, E. A. B. **et al.** Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 47(2), p. 283-296, 2003.

GALATI, E. A. B. **et al.** Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública.** v. 31, n. 4 p. 378-390, 1997.

GALVIS-OVALLOS, F. **et al.** Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of Sao Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**. v. 24, Jan 2017.

GENTILE, B. **et al.** Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as a reservoir host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 75, p. 612–613, 1981.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) – e observações ecológicas sobre algumas espécies. **Ver. Saúde Públ. São Paulo**, v. 11. p. 284-7, 1977.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36(1), p. 71-80, jan-fev 2003.

GONZÁLEZ, E. **et al.** Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. **Acta Tropica**. v.171, p. 68-73, 2017.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am**. v. 26, p. 293–307, 2012.

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.

GRASSI, B. Ricerche sui Flebotomi. **Mem. Mat. Fis. Soc. Ital. Sc.** v. 14, p. 353-393, 1907.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3 ed. St. Louis, Elsevier, p. 1387, 2006.

GUIMARÃES E SILVA, A. S. **Ecologia de Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) e sua Interação com *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) e Hospedeiros Leishmanioses Vertebrados em áreas de Transmissão de Leishmanioses**. 119f. 2016. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** v. 18, p. 332–334, 2002.

HAOUAS, N. **et al.** Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1054-1059, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [IBGE]. **Estrutura territorial** [Internet]. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15774-malhas.html?=&t=acesso-ao-produto>. Acessado em 20 out de 2018.

JIMÉNEZ, M. **et al.** Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid. Spain. **Parasitology Resources.** v. 112, p. 2453–2459. 2013.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.** v. 22, p. 439–445, 2006.

KENT, R. J. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resources.** v.9, p.4–18. 2009.

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

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol.** v. 17, p. 279–289, 1999.

KOEHLER, K. **et al.** Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology.** v. 109, p. 9–17, 2002.

KUHLS, K. **et al.** Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v.5, n.6, p.1-16, 2011.

LAINSON, R. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** v. 64, p. 200–207, 1989.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** London: Press Inc; p. 12-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 62(3), p. 385-95, 1968.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the new world. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections,** 10th ed. London: E Arnold; p. 313-49, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcinctus* in Amazonian Brazil. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** v. 64, p. 3–9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections (9a ed).** London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pianbois” in north Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 75, p. 611–612, 1981.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude,** Ananindeua , v. 1, n. 2, p. 13-32, jun. 2010.

LANE, R. P. Sandflies (Phlebotominae). In: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (Eds.), **Medical Insects and Arachnids.** Chapman and Hall, London, p. 78–119, 1993.

LATROFA, M. S. **et al.** Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. **Acta Trop.** v. 119, p. 91-98, ago 2011.

LEVINE, N. D. **et al.** A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology.** v. 27, p. 37-58, 1980.

LEWIS, D. J. **et al.** Proposals for a stable classification of phlebotomine sandflies. **Systematic Entomology.** v. 2, p. 319-332, 1977.

LIMA, H. **et al.** Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 169–174, 2002.

LIMA, H. **et al.** Evidence of *Leishmania* spp. antibodies and DNA in bush dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. **J. Zoo Wildl. Med.** v. 40, p. 91–94, 2009.

LOPES, E. G. **et al.** Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiology and Infection.** v. 146 (3). p. 401-406, 2018.

MACEDO, I. T. F. **et al.** Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal.** v. 18, p. 67-71, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. **Veterinary Medicine.** v.13, p.46-49, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A. N. **et al.** Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública.** v.24, p. 2941-2947, 2008.

MARASSÁ, A. M. **et al.** Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 46, n. 5, p. 547-554, 2013.

MARCONDES, C. B.; SANTOS NETO, L. G.; LOZOVEI, A. L. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, p. 255-260, 2001.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013

MARCUSSI, L. M. **et al.** Evaluation of Specific Primers for species identification of *Leishmania (V.) braziliensis*. **Revista de Patologia Tropical**. v.42, n.1, p.64-71, 2013.

MAROLI, M. **et al.** Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARZOCHI, M. C. A. **et al.** Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo**. v. 22, p. 149-155, 1980.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 63, p. 82-104, 1992.

MAURICIO, I. L. **et al.** Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**. v. 119, p. 237-46, 1999.

MAYO, R. C. **et al.** Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 31, n. 4, p. 339-345, 1998.

MEMMOTT, J. Patterns of sandfly distribution in tropical forest: a causal hypothesis. **Medical and Veterinary Entomology**. p. 188±194, 1992.

MEMMOTT, J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. **Medical and Veterinary Entomology**. p. 403±411, 1991.



MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, p.56-72, 2005.

MICHALSKY, E. M. **et al.** Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**. v. 44, p. 255-259. 2002.

MICHALSKY, E. M. **et al.** Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 56-61, 2009.

MILLS, J. N.; CHILDS, J. E. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. **Emerg. Infect. Dis.** v. 4, p. 529–537, 1998.

MISCEVIC, Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. **Acta Veterinary (Beograd)**. v. 31, p. 32-39, 1981.

MORICONI, M. **et al.** Phlebotomine sand fly borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 11, 2017.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 49.1, p. 68-75, 1993.

NAIFF, R. D. **et al.** Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 86, p. 317–321, 1991.

OLIVEIRA, S. S. **et al.** Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2018. **BEPA**. v. 16(192), p. 29-46, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Control of the leishmaniasis. **Technical report series 793**. 1990.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Geneva: Leishmaniasis – **Fact sheet Updated 2019 March 14**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 03 agosto de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Record**. v. 91(22), p. 285-296. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE [OPAS]. Leishmanioses: **Informe Epidemiológico nas Américas**: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017 Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754). Acesso em 03 de agosto de 2019.

PARAGUASSU-CHAVES, C. A. Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental). **Rondônia: Edufro**. 2001.

PASSOS, V. M. **et al.** *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting pacientes with american cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast, Brazil. **Acta Tropica**, v.72, p.251-258, 1999.

PASSOS, V. M. A. **et al.** Natural infection of a domestic cat *Felis domesticus* with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, p.19-20, 1996.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**. v. 48, p. 949-950, 1934.

PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), Canine leishmaniasis: moving towards a solution. **Intervet International**, Boxmeer. p.39-48, 2002.

PEREZ, J. E. **et al.** Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 88, p.161-164, 1994.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal of Parasitology**. v. 88, p. 972-8. 2002.

PERRUOLO, G.; NORIS RODRÍGUEZ, N.; FELICIANGLI, M. D. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Lutzomyia spinicrassa* (species group *Verrucarum*) Morales Osorno Mesa, Osorno and Hoyos 1969, in the Venezuelan Andean region. **Parasite**. v. 13, p. 17-22, 2006.

PESSÔA, S. M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

PITA-PEREIRA, D. **et al.** Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 99, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D. **et al.** *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in a specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop**. v. 120, p. 273-5, 2011.

PITA-PEREIRA, D. **et al.** First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **Am J Trop Med Hyg**. v. 80, p. 593-5, 2009.

QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Geographic Information System**. [Internet]. Open Source Geospatial Foundation Project. 2016. Disponível em: <http://qgis.osgeo.org>. Acessado em 20 out de 2018.

QUARESMA, P. F. **et al.** Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 480-485, 2012.

QUINNELL, R.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**. v.136, 14<sup>a</sup> ed., p.1915-1934, 2009.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 104(7), p. 937-54, 2009.

RAYMOND, R. W. **et al.** Temporal and spatial distribution of *Leishmania mexicana* infections in a population of *Neotoma micropus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, p. 171–180, 2003.

REY, L. **Parasitologia.** 3<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.214-266, 2001.

READY, P. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology.** v. 58, p. 227–250, 2013.

REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: relationship to disease transmission by malaria and arbovirus vectors. **Bulletin of the Society of Vector Ecology.** v. 14, p. 67–70, 1989.

ROBERTS, D. M. Arabian sandflies (Diptera, Psychodidae) prefer the hottest nights? **Medical and Veterinary Entomology.** v. 8, p. 194-198, 1994.

ROLÃO, N. **et al.** Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite.** v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

RONDANI, C. Sopra una specie di insetto dittero. **Memoria prima per servire alla Ditterologia italiana.** Parma 1. 1840.

ROQUE, A. L. R.; **et al.** *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 4, e589, 2010.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl.** v. 3, p. 251–62, 2014.

ROSSI, E. **et al.** Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high

endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. **Acta Tropical**. v. 105, p.158–165, 2008.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**. v. 2, n. 1, p. 1261-1401, 1903.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. **Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States**. 2003. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/canine-visceral-leishmaniasis-and-its-emergence-in-the-united-states/#page->>. Acessado em: 25 de janeiro de 2014.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 74, p. 81–96, 2006.

RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of plebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. **Environmental Entomology**. v. 4, p. 71-77, 1975.

SALES, K. G. S. **et al.** Identification of Phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. **Parasites & Vectors**. v. 8, n. 230, 2015. DOI 10.1186/s13071-015-0840-3.

SANT'ANNA, M. R. **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, n. 3, p. 230–7, 2008.

SÃO PAULO (Estado). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. **Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD**. São Paulo: A Secretaria, 158p., 2006.

SARAIVA, L. **et al.** The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p.1033-1039, 2010.

SARAIVA, L. **et al.** Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 39, n. 1, p. 56-63, 2006.

SARAVIA, N. G. L. **et al.** The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases.** v. 159, p. 725-735, 1989.

SAVANI, E. S. M. M. **et al.** The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology.** v.120, p.229-233, 2004.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **J Med Ent.** v. 23(1), p. 11-5, 1986.

SCHUBACH, T. M. P. **et al.** American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v.98, n.3, p.165–167, 2004.

SCOPOLI, J. A. Deliciae florae et faune Insubricaе. **Pavia.** 85p, 1786.

SCORZA, J. V.; ORTIZ, I.; GOMEZ, I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 6- Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de “Rancho Grande”. **Acta Biologica Venezuelica.** v. 6, p. 76-83, 1968.

SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cell Immunol.** v. 309, p. 1-6, 2016.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 91, p. 671–683,1996.

SHERLOCK, I. A. **et al.** Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 79, p. 511,1984.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania Mexicana amazonensis*). **Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 66, p. 709-717, 1972.

SHIMABAKURO, P. H. F.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys.** v. 660, p. 67–106, 2017.

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

SHIMABUKURO, P. H. F.; TOLEZANO, J. E.; GALATI, E. A. B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. **Pap. Avulsos Zool.** (São Paulo), São Paulo, v. 51, n. 27, p. 399-441, 2011.

SILVA, E. A. **et al.** Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 343-348, 2008.

SILVA, M. D. **Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de *Leishmania infantum* por dois quimiotipos do complexo *Lutzomyia longipalpis*.** 70f, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, São Paulo, 2019.

SILVA, V. G. **Aspectos entomológicos e infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em municípios do estado de São Paulo com autoctonia de transmissão de leishmaniose visceral humana e/ou canina.** 135f, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

SILVEIRA, F. T; CORBETT, C. E. P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 143-147, jun. 2010.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Editora CEJUP; 1997.

SILVEIRA, F. T. **et al.** Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brasil. **Rev Inst Med Trop**. Sao Paulo, v. 33(1), p. 18-22, Jan-Fev 1991b.

SILVEIRA, F. T. **et al.** Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominidae) by *Leishmania lainsoni* in Pará State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 86(1), p. 127-30, 1991a.

SOARES, I. R. **et al.** First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3, p. 665-669, 2013.

SOARES, V. Y. **et al.** Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome b gene. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 379-383, 2014.

SOLANO-GALLEGO, L. **et al.** Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 76, n. 4, p. 676–680, 2007.

SOUZA, F. J. M. S. **Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Parque Estadual do Jaraguá na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil**. 63 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2017.

SPADA, J. C. P. **et al.** A. Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) e leishmaniose visceral canina em uma área rural de Ilha Solteira, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 456-462, 2014.



STAUCH, A. **et al.** Treatment of Visceral Leishmaniasis: Model-Based Analyses on the Spread of Antimony-Resistant *L. donovani* in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 6(12), p. e1973, 2012.

STAUCH, A. **et al.** Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent: Modelling Epidemiology and Control. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5(11), p. e1405, 2011.

TEODORO, U. **et al.** Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná - Brasil: Variação Sazonal e Atividade Noturna. **Rev. Saúde Pública,** São Paulo, v. 27, n. 3, p. 190-194, 1993.

THEODOR, O. Classification of the world species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Bull Entomol Res.** v. 39, p. 85-115, 1948.

TOLEZANO, J. E. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in State of São Paulo, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 89, p. 427-434, 1994.

TOLEZANO, J. E. **et al.** The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.** v. 149(3-4), p. 280-284, 2007.

TOMMASI, A. S. **et al.** Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasit. Vectors.** v. 6, p. 97, 2013.

TRAVI, B. L. **et al.** Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 887–892, 2002.

TRUPPEL, J. H. **et al.** Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas? **PloS One.** v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.

VASCONCELOS, I. A. **et al.** The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturité, northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 50, p. 158–164, 1994.

VEDOVELLO-FILHO, D. **et al.** American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**. v. 55, n. 3, p. 149-155, 2008.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26(4), p. 644-645, 2010.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saúde Pública**. v. 48(5), p. 851-855, 2014.

XIMENES, M. F. F. M. **et al.** Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotrop Entomol.** v. 36, p. 128-137, 2007.

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**, v. 54, p. 881, 1994.