Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de *Leishmania infantum* por dois quimiotipos do complexo *Lutzomyia longipalpis*

Mariana Dantas da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Epidemiologia
Orientadora: Profª Drª Eunice Aparecida Bianchi Galati
Co-orientador: Dr. Fredy Galvis Ovallos

São Paulo
2019

Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de *Leishmania infantum* por dois quimiotipos do complexo *Lutzomyia longipalpis*

Mariana Dantas da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Epidemiologia
Orientadora: Profª Drª Eunice Aparecida Bianchi Galati
Co-orientador: Dr. Fredy Galvis Ovallos

Versão Revisada

São Paulo

2019

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano de dissertação.

“Por mais inteligente que alguém possa ser, se não for humilde, o seu melhor se perde na arrogância. A humildade ainda é a parte mais bela da sabedoria”

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- pelo apoio através da bolsa concedida.

À minha querida e amada mãe, por ser minha base e meu alicerce, por nunca colocar em prova a minha capacidade em realizar projetos, por seus conselhos e sua infinita sabedoria, e que apesar de ter uma origem humilde é rica no que se tem mais valor, a humildade e o amor! Te amo!

Ao meu irmão Marco, por seu apoio durante toda a caminhada, me incentivando a ser cada vez melhor, sempre se orgulhando de sua irmã caçula, me ajudando até mesmo nos experimentos em laboratório, sua participação é e sempre será importante em minha vida.

À minha orientadora Profª Eunice Apª Bianchi Galati, por ter me aceitado como estagiária de seu laboratório, com certeza esse foi um passo muito importante para que posteriormente realizássemos esse trabalho de mestrado.

Ao meu Co-orientador Dr. Fredy Galvis Ovallos, por todo seu incentivo para que eu viesse a cursar o mestrado, por todos os momentos de trabalho em campo e em laboratório, por tudo que me ensinou.

Aos funcionários da SUCEN de Dracena e Mogi Guaçu, pelo apoio durante as coletas.

Aos moradores de Dracena e Valinhos que permitiram a realização de coletassem suas residências.

Ao Prof Dr. Everton Falcão de Oliveira pela participação da minha banca de qualificação e por suas sugestões.

À Thaíse Yumie Tomokane e Dr. Márcia Dalastra Laurenti da Faculdade de Medicina da USP, pela disponibilização das leishmanias utilizadas para os experimentos de alimentação artificial.

Ao Dr. Claúdio Casanova, por toda ajuda durante as coletas, sempre muito alegres e proveitosas, por suas importantes sugestões neste trabalho e por sempre me tratar com muito apreço.

À Profª Dr. Trícia Maria Oliveira, pela disponibilização dos gatos para os experimentos de xenodiagnóstico, por disponibilizar seu laboratório para as análises moleculares e por suas sugestões neste trabalho.

À Dr. Priscila Bassan Sábio, por suas sugestões e por sempre ser essa pessoa agradável e incentivadora, suas palavras foram e são sempre um combustível, principalmente nas horas de desespero “Relaxa, Mari! Seu trabalho está lindo!”.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Aplicada (LMVPA) João Leonel, por todos os ensinamentos, por toda paciência, por ter me acolhido em sua casa e me dado toda atenção que precisava durante esse processo, a Geovanna Vioti por toda a ajuda em laboratório e pelas fotos cedidas para ilustrar a dissertação, ao Alex estagiário e a Júlia funcionária que muito fizeram, pela ajuda prestada e pelo tempo que disponibilizaram para mim.

Aos alunos da UNESP de Ilha Solteira: Diogo, Maria Fernanda, Maria Luana e Júlio pelo apoio durante os experimentos de xenodiagnóstico.

À Dr. Marcia Bicudo, por sempre ser essa pessoal solicita, sempre ajudando em tudo que pode.

Às minhas amigas Fernanda, Jane e Gi, pessoas incríveis, que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Suas palavras, seus puxões de orelha e principalmente as risadas que compartilhamos foram (e são) essenciais para me dar forças, não só em relação a vida acadêmica, mas em minha vida em geral, sem vocês minha vida seria mais difícil.

Aos amigos que a vida acadêmica me trouxe Sandra, Ivy, Laura, Bruna e Bruno por todos os momentos de desabafos, reflexões, incentivos e digamos “recreação” durante o período que permaneci na Faculdade de Saúde Pública, e um agradecimento especial a Vanessa Gusmon, pessoa de coração gigante, que além de participar de todos os outros momentos também me ajudou muito, mas muito no desenvolvimento deste trabalho, com certeza todo esse processo teria sido muito mais difícil sem você, obrigada por ser assim, essa pessoa maravilhosa!

RESUMO

DANTAS DA SILVA, M. Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de *Leishmania infantum* por dois quimiotipos do complexo *Lutzomyia longipalpis*. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

Introdução: A leishmaniose visceral é causada por *Leishmania infantum* e tem *Lutzomyia longipalpis* como o principal vetor no Brasil. Análises químicas de feromônios produzidos por machos da espécie sugerem que *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies, formado por quatro quimiotipos: 3α-himachaleno, (S)-9-metilgermacreno-B, cembreno-1 e cembreno-2. No estado de São Paulo, dois quimiotipos estão presentes: (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1, e é notável a rápida expansão urbana de ambas populações, associada à LV, tanto canina como humana. Por outro lado, a LV associada à população cembreno-1 de *Lu. longipalpis* tem um perfil mais rural e está relacionada a população canina. Na dinâmica de transmissão da LV é reconhecido o papel do cão doméstico (*Canis familiaris*) como fonte de infecção para os flebotomíneos e a presença de cães infectados tem sido apontada como fator de risco para a LV em humanos. Todavia, o papel de outras populações de animais presentes em áreas urbanas é desconhecido. Gatos (*Felis catus*) frequentemente estão presentes em domicílios e infecções destes animais com *Le. infantum* têm sido relatadas, mas o seu papel como fonte de infecção para os flebotomíneos não está esclarecido. **Objetivo:** Investigar aspectos ecológicos relacionados ao potencial de duas populações do complexo *Lu. longipalpis*: (S)-9-metilgermacreno- B e cembreno-1, em se infectarem por *Le. infantum*, com base em infecção natural ou se alimentando em modelo artificial, e também para a população (S)-9-metilgermacreno-B alimentando em modelo animal representado por gatos comprovadamente infectados por *Le. infantum*. **Métodos**: Foram realizadas capturas nos municípios de Dracena e Valinhos, no estado de São Paulo, para obtenção de amostras das duas populações alvo do estudo para a investigação de infecção natural, realização de infecção experimental por meio de alimentação sanguínea em modelo artificial e animal. **Resultados:** A infecção natural foi detectada apenas na população de *Lu. longipalpis* cembreno-1, com taxa de 4,2%. Nos experimentos de infecção em modelo artificial as duas populações de *Lu. longipalpis* apresentaram infecção após o repasto. Nas fêmeas que realizaram repasto sanguíneo em gatos infectados não foram observadas formas

flageladas. **Conclusão:** A detecção de fêmeas naturalmente infectadas no município de Valinhos sugere um alto risco de transmissão de leishmaniose na área de estudo. As populações utilizadas no estudo não apresentaram diferenças na susceptibilidade de infecção por *Le. infantum* em modelo artificial. Gatos infectados por *Le. infantum* não se mostraram como fonte de infecção para *Lu. longipalpis* no xenodiagnóstico.

Palavra chaves: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, *Lutzomyia longipalpis*, (S)-9-metilgermacreno-B, cembreno-1, infecção natural, infecção experimental.

ABSTRACT

DANTAS DA SILVA, M. Investigation of ecological factors related to the potential transmission of *Leishmania infantum* by two chemotypes of the *Lutzomyia longipalpis* complex. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

Introduction: Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum* having *Lutzomyia longipalpis* as the main vector in Brazil. Chemical analyzes of pheromones produced by males suggest that *Lu. longipalpis* is a species complex composed of four chemotypes: 3α-himachalene, (S) -9-methylgermacrene-B, cembrene-1 and cembrene-2. In the state of São Paulo, two chemotypes are present: (S)-9-methylgermacrene-B and cembrene-1, and has been observed the rapid urban expansion of both populations associated with LV canine and human. On the other hand, the LV associated with the cembreno-1 population of *Lu. longipalpis* has a more rural profile and is related to the canine population. In the transmission dynamics of LV, the role of the domestic dog (*Canis familiaris*) as a source of infection for sandflies is recognized and the presence of infected dogs is a factor of risk for LV in humans. However, the role of other animal populations present in urban areas as infection source is unknown. Cats (*Felis catus*) are often present in households and infections of these animals with *Le. infantum* have been reported, but their role as a source of infection for sandflies is unclear. **Objective:** To investigate ecological aspects related to the potential of two populations of the *Lu. longipalpis* complex, (S) -9-methylgermacrene-B and cembrene-1, to be naturally infected by *Le. infantum* or acquire the infection by feeding in an artificial feeder, and also for the (S) -9-methylgermacrene-B population feeding in an animal model represented by cats proven to be infected by *Le. infantum*. **Methods:** Captures were carried out in the municipalities of Dracena and Valinhos, in the state of São Paulo to obtain samples of the two target populations of the study for the investigation of natural infection, experimental infection by means of blood supply in artificial and animal models. **Results:** The natural infection by *L. infantum* was only observed in the population cembreno-1, with a 4.2% rate. In the experiments of infection in artificial model the two populations of *Lu. longipalpis* presented infection after repast. In females that have fed in infected cats, no flagellated forms were observed. **Conclusion:** The

detection of naturally infected females in the city of Valinhos suggests a high risk of transmission of leishmaniasis in the study area. The populations used in the study did not show differences in the susceptibility of infection by *Le. infantum* in artificial model. Cats infected by *Le. infantum* did not show up as a source of infection for *Lu. longipalpis* in xenodiagnosis.

Key words: Visceral leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania infantum*, (S) -9-methylgermacrene-B, cembreno-1, natural infection, experimental infection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES 13
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO 14
1.3 BIOLOGIA DO PARASITA 15
1.4 BIOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS 17
1.5 COMPLEXO *Lutzomyia longipalpis* 17
1.6 LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA (LVF) 21
2. JUSTIFICATIVA 23
3. OBJETIVOS 25
3.1 OBJETIVO GERAL 25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
4. MATERIAIS E MÉTODOS 26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA 26
4.2 INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL 28
4.2.1 Extração de DNA 30
4.2.2 PCR 30
4.2.3 Sequenciamento 31
4.3 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SUSCEPTIBILIDADE DAS DUAS POPULAÇÕES DE *Lu. longipalpis* À INFECÇÃO POR *Le. Infantum* 31
4.4 CULTIVO DAS POPULAÇÕES DO COMPLEXO *Lu. longipalpis* EM LABORATÓRIO 31
4.4.1 Alimentação das fêmeas 32
4.4.2 Individualização das fêmeas 32
4.4.3 Transferência de ovos, alimentação das larvas e seguimento das formas imaturas ... 33
4.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM MODELO ARTIFICIAL: 36
4.5.1 Preparo do sangue contendo parasitos 36
4.5.2 Sistema de alimentação em membrana 36
4.6 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE *Lu. longipalpis* ALIMENTADAS EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) INFECTADOS NATURALMENTE POR *Le. infantum* 38

4.6.1 Exposição dos gatos infectados por *Le. infantum* (População (S)-9-metilgermacreno-B) ... 38

4.6.2 Análise de dados ... 40

5. RESULTADOS ... 41

5.1 INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Le. infantum* nas populações (S)-9 metilgermacreno-B e cembreno-1 de *Lu. longipalpis* ... 41

5.2 INFECÇÃO REALIZADA EM MODELO ARTIFICIAL: ... 45

5.3 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE FÊMEAS DE *Lu. longipalpis* ALIMENTADAS EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Le. infantum* ... 47

5.3.1 Xenodiagnóstico ... 47

6. DISCUSSÃO ... 50

7. CONCLUSÕES ... 54

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ... 55

ANEXO A ... 65

ANEXO B ... 66

CURRÍCULO LATTES ... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação clínica dos gatos com *Le. infantum* utilizados no experimento. .. 38

Tabela 2 - Descrição das capturas realizadas no município de Dracena-SP, junho - outubro de 2018, segundo data e quantidade de fêmeas dissecadas. 41

Tabela 3 - Descrição do número de coletas realizadas, período de coleta, localidade, número de fêmeas, positividade no exame parasitológico e espécies encontradas. Coletas realizadas no município de Valinhos-SP 43

Tabela 4 - Número de fêmeas segundo população e estado de infecção..... 45

Tabela 5 - Número de fêmeas segundo população e intensidade da infecção no quinto dia para ambas as populações e oitavo dia para cembreno-1 após repasto infectivo realizado em sistema de alimentação artificial..... 46

Tabela 6 - Distribuição de fêmeas desafiadas a se alimentarem em gatos infectados com *Le. infantum*, ingurgitadas e dissecadas segundo experimento de xenodiagnóstico. 47

Tabela 7 - Total de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas no primeiro experimento. Gatos com sinais clínicos e sem sinais clínicos. Indicando presença de sangue e presença de ovos..... 48

Tabela 8 - Total de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas na segunda experimento do xenodiagnóstico. Gatos com sinais clínicos e sem sinais clínicos. Indicando presença de sangue e presença de ovos. 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do Ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos. A: formas amastigotas; B: formas procíclicas em divisão; C: formas nectomonas saindo pela matriz peritrófica e se aderindo ao epitélio intestinal; D: Formas leptomonas em divisão; E: formas metacíclicas; F: formas haptomonas aderidas a válvula estomodeal. 16

Figura 2 - Localização geográfica dos diferentes quimiotipos encontrados em *Lu. longipalpis* 19

Figura 3 - Distribuição de casos de LV pelo estado de São Paulo compreendendo o período de 1998-2013: (A) para os casos caninos, (B) para os casos humanos. (C) Distribuição geográfica das diferentes populações *Lu. longipalpis.* 20

Figura 4 - Localização do município de Dracena, estado de São Paulo. 26

Figura 5 - Imagens do local de captura peridomicílio no município de Dracena: (A) visão externa; (B) visão interna. 27

Figura 6 - Localização do município de Valinhos, estado de São Paulo. 28

Figura 7 - Imagem da paisagem de um dos locais de captura no município de Valinhos: (A) visão externa; (B) visão interna. 28

Figura 8 - Etapas para dissecção de fêmeas de flebotomíneos. A: Retirada das asas, patas e cabeça; B: posicionamento da fêmea com um estilete no tórax e outro na porção final do abdome; C: exposição total do intestino e D: Fêmea pronta para observação em microscópio para investigação de formas flageladas. 29

Figura 9 - (A) Imagem das gaiolas utilizadas para a manutenção dos flebótomos durante a alimentação sanguínea; (B) Imagem ilustrativa do repasto sanguíneo de fêmeas de *Lu. longipalpis* em codorna. 32

Figura 10 - Imagem do recipiente de acrílico utilizado para individualização de fêmeas pós alimentação sanguínea. 33

Figura 11 - Imagem do recipiente de acrílico utilizado para agrupamento de fêmeas pós alimentação sanguínea. 33

Figura 12 - Imagem do sistema utilizado para a manutenção das formas imaturas de *Lu. longipalpis.* 34

Figura 13 - Ciclo de desenvolvimento das formas imaturas de *Lu. longipalpis* observado em microscópio estereoscópio. (A) ovos; (B) larva de 1º estádio (L_1); (C) larva de 2ºestádio (L_2); (D) larva de 3ºestádio (L_3); (E) larva de 4º estádio (L_4) e (F) pupa. 35

Figura 14 - Imagem ilustrativa do sistema de alimentação artificial para fêmeas de flebotomíneos. (A) Membrana de pele de pintinho colocada no alimentador artificial. (B) Destaque para o alimentador encaixado na gaiola com flebotomíneos. (C) Sistema de alimentação artificial. (D) Destaque para as fêmeas se alimentando no sistema de membranas. 37

Figura 15 - Imagem ilustrativa do procedimento para exposição dos gatos no xenodiagnóstico (A e B) Imagens mostrando as lesões em um gato. (C) Gaiola utilizada para realização do xenodiagnóstico. (D) Gato sedado em momento de exposição às fêmeas de *Lu. longipalpis.* 39

Figura 16 - Presença de aglomerados de flagelados (indicados pela seta) no exame parasitológico positivo para *Le. infantum* (A) Região da válvula estomodeal. (B) Região do intestino médio torácico. (C) Região do intestino médio abdominal. 42

Figura 17 - Imagem de Gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 220 pb nas amostras positivas para o gene IVS6 (Cac) de flebotomíneo provenientes de campo. DR: Dracena/VL: Valinhos. 44

Figura 18 - Imagem de gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 120 pb nas amostras positivas para o gene 13A/13B gene de *Leishmania* ssp. Apresentando positividade para fêmeas provenientes de área de transmissão canina no município de Valinhos. DR=Dracena/VL=Valinhos. 44

Figura 19 - Imagem de gel de agarose 1,5 % mostrando a banda esperada de 300 pb nas amostras positivas para o gene ITS-1 gene de Tripanossomatideo ssp. 45

Figura 20 - Distribuição de fêmeas das populações (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 de *Lu. longipalpis* alimentadas em membrana artificial segundo intensidade de infecção com flagelados de *Le. infantum.* 46

Figura 21 - Distribuição de fêmeas da população cembreno-1 do complexo *Lu. longipalpis* segundo infecção no quinto e oitavo dia após repasto infectivo. 47

Figura 22 - Distribuição de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas segundo estado de infecção dos felinos (*Felis catus*) e experimento do xenodiagnóstico. 49

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses têm como agente causal protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, transmitidos aos vertebrados através da picada de fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). Registradas em 98 países das regiões tropicais e subtropicais, estima-se que 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão das leishmanioses, que se constituem em um complexo de doenças com diferentes espectros clínicos. Dentre as manifestações clínicas, são encontradas as formas: cutânea localizada, cutânea disseminada, mucocutânea e visceral, que podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do indivíduo, entre outros fatores (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

Dentre as formas clínicas, a cutânea é a mais prevalente, sendo registrada em 88 países, distribuída por quatro continentes: África, Ásia, América e Europa (ALVAR et al., 2012).

Nas Américas, as espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas cutâneas da doença humana são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis, Le. (Le.) garnhami, Le. (Le.) martiniquensis, Le. (Le.) mexicana, Le. (Le.) pifanoi, Le. (Le.) venezuelensis, Le. (Le.) waltoni, Le. (Viannia) braziliensis, Le. (Vi.) guyanensis, Le. (Vi.) lainsoni, Le. (Vi.) lindenbergi, Le. (Vi.) naiffi, Le. (Vi.) panamensis, Le (Vi.) peruviana* e *Le. (Vi.) shawi* (LAINSON e SHAW, 2005; DESBOIS et. al. 2014; SHAW et al., 2015; ESPINOSA et al., 2016).

A forma cutânea localizada caracteriza-se pela presença de lesões nodulares no local da picada do inseto, enquanto a forma cutânea disseminada se manifesta por lesões nodulares de tamanhos variados e espalhados por todo o corpo. A leishmaniose mucocutânea, a mais grave dentre as formas cutâneas, caracteriza-se por lesões presentes no nariz, boca, palato, faringe, laringe, podendo causar a destruição de toda a cavidade oral. Sua manifestação pode ocorrer meses ou até anos após o surgimento das primeiras lesões (DAVID e CRAFT, 2009; GOTO e LINDOSO, 2012).

A leishmaniose visceral é causada por *Leishmania infantum* e tem *Lutzomyia longipalpis* como o vetor principal nas Américas. É considerada endêmica em 12 países das Américas, os quais, de acordo com o cenário epidemiológico, são classificados em:

países com expansão da transmissão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com controle de transmissão (Colômbia e Venezuela) e países com casos esporádicos de transmissão (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (PAHO, 2016).

O Brasil é o único país no continente americano considerado entre os cinco países do mundo (Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal, Brasil) que juntos respondem por 90% dos casos da leishmaniose visceral, com a maior incidência registrada na Região Nordeste (LAINSON e RANGEL, 2003; ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Entre os anos de 2000 e 2017, um total de 60.997 casos de LV foram registrados em todo o país, com um total de 4.187 óbitos, e a Região Nordeste respondendo por 54% dos casos, seguida das Regiões Norte com 17% e Sudeste com 16% (MS, 2017).

No estado de São Paulo, entre 1999 e 2016, 2.712 casos de LV em humanos foram registrados, com um total de 233 óbitos. Dos 645 municípios paulistas, 178 (27,6%) apresentam positividade para a presença do vetor (HIRAMOTO et al., 2019).

O primeiro registro de *Lu. longipalpis* em área rural neste estado ocorreu no município de Salto de Pirapora, na década de 70 (FORATTINI et al., 1970), e em área urbana no município de Araçatuba, no ano de 1997 (COSTA et al., 1997). Logo depois, no ano de 1998, o primeiro caso autóctone canino da doença foi registrado neste município, seguido pelo primeiro caso autóctone humano, em 1999 (TOLEZANO et al., 1999).

A presença de abrigos de animais domésticos, como galinheiros e canis propiciam altas densidades de *Lu. longipalpis*, que apresenta hábito alimentar eclético (COLLA - JACQUES et al., 2010; HOLCMAN et al., 2013).

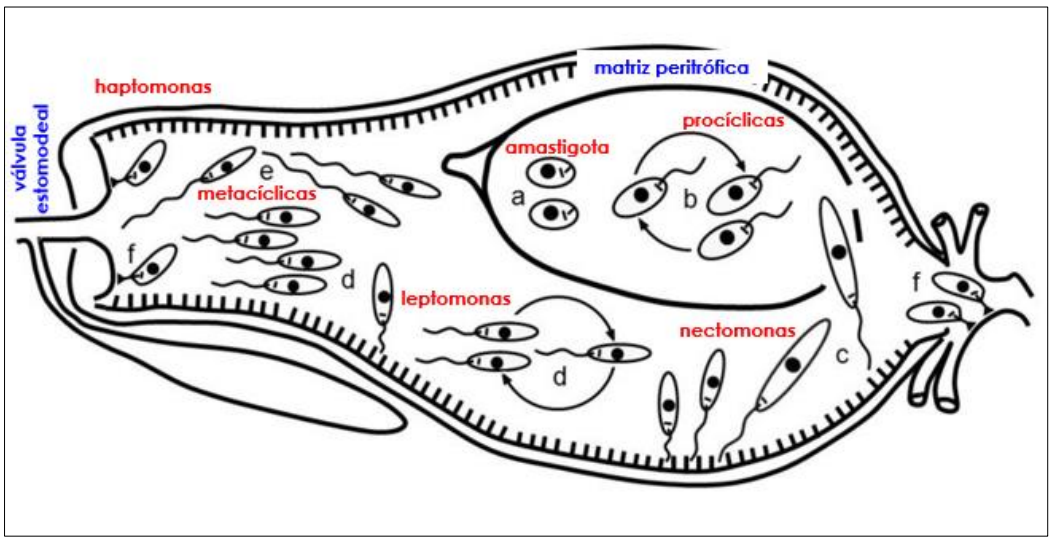
Estudos epidemiológicos sobre a doença no estado de São Paulo têm apontado que a densidade elevada do vetor no período compreendido entre os meses de outubro a março (estação com predominância de chuvas), associada à alta prevalência de casos caninos da doença são uma condição precursora para a ocorrência dos casos humanos em área urbana (GALVIS - OVALLOS et al., 2017).

1.3 BIOLOGIA DO PARASITA

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas formas principais de desenvolvimento: promastigota, forma flagelada presente no intestino do vetor, e amastigota, forma aflagelada intracelular obrigatória encontrada no hospedeiro vertebrado (MC GWIRE e SATOSCAR, 2014).

O ciclo do parasita inicia-se quando a fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue. No intestino médio abdominal, o sangue ingerido é envolto pela matriz peritrófica, as alterações fisiológicas que ocorrem no local estimulam a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, que se multiplicam intensamente, e em seguida, se diferem em formas nectomonas. A degradação da matriz peritrófica permite que as nectomonas migrem para o lúmen intestinal rumo ao epitélio, onde permanecem aderidas em suas microvilosidades e, em seguida, diferenciam-se em leptomonas. Estas se multiplicam intensamente, sendo que uma porção se diferencia em haptomonas que migram e se aderem à válvula estomodeal, e a outra porção realiza a metaciclogênese, que consiste na diferenciação das leptomonas em promastigotas metacíclicas - forma infectante (Figura 1). As leptomonas secretam uma substância gelatinosa denominada PSG (Promastigote Secretory Gel), envolvendo os parasitas na parte torácica do intestino médio. Todo este processo pode ocorrer concomitantemente com o ciclo gonotrófico da fêmea, assim, o estágio de metaciclogênese pode coincidir com o período de um novo repasto sanguíneo. As haptomonas causam danos à válvula estomodeal e o gel secretado pelas promatigotas juntamente com as formas derivadas das leptomonas formam uma espécie de tampão que bloqueia a passagem do fluxo sanguíneo. Desta forma, a fêmea não consegue se alimentar de maneira eficiente, e devido ao dano causado na válvula estomodeal o sangue é regurgitado com as formas infectantes durante a tentativa de alimentação. Ao não conseguir se alimentar, a fêmea busca outra fonte de alimentação, podendo assim infectar mais de um hospedeiro mamífero (DÓSTALÓVA e VOLF, 2012).

Figura 1 - Esquema do Ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* spp. em fêmeas de flebotomíneos. A: formas amastigotas; B: formas procíclicas em divisão; C: formas nectomonas saindo pela matriz peritrófica e se aderindo ao epitélio intestinal; D: Formas leptomonas em divisão; E: formas metacíclicas; F: formas haptomonas aderidas a válvula estomodeal.



Fonte: adaptado de Dostálová e Volf (2012).

Esses parasitos podem se desenvolver em diferentes partes do intestino do vetor, variando de acordo com a espécie de leishmânia. Assim, podem ser classificadas em: suprapilária (quando ocupam a parte anterior e média do intestino), peripilária (quando se desenvolvem no intestino anterior médio e posterior) e hipopilária (quando ocupam apenas o intestino posterior) (GONTIJO e CARVALHO, 2003; PIMENTA et al., 2003; PIMENTA et al., 2012).

Algumas barreiras precisam ser transpostas para que ocorra o desenvolvimento da leishmânia no inseto vetor, é necessário que o protozoário consiga inibir ou retardar os efeitos prejudiciais das enzimas digestivas do inseto, posteriormente o escape da matriz peritrófica precisa ocorrer para que os parasitas consigam se fixar ao epitélio intestinal para que não sejam expulsos junto ao conteúdo fecal, permitindo assim a posterior migração em direção a região torácica (KAMHAWI, 2006).

1.4 BIOLOGIA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte, medindo cerca de 3 mm, apresentam o corpo coberto por intensa cerdosidade e são popularmente conhecidos por: birigui, asa branca, cangalhinha, tatuquira, mosquito palha, asa dura entre outros. São bem adaptados a ambientes úmidos, pouca incidência da luz solar direta e com temperatura entre 20ºC e 30ºC (FORATTINI, 1973; BRAZIL e BRAZIL, 2003; MARCONDES, 2011).

Por serem insetos holometábolos, passam por uma metamorfose completa, compreendendo os estágios de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositam seus ovos em substrato terrestre úmido e rico em matéria orgânica em decomposição. As formas larvais são pequenas, o que dificulta a sua visualização a olho nu, brancas e de aspecto vermiforme. Seu corpo é formado por 12 segmentos, além da cabeça, sendo três torácicos e nove abdominais. Após a eclosão podem se alimentar de restos de adultos mortos, das cascas dos ovos ou de qualquer outro tipo de matéria orgânica disponível no ambiente. A cabeça apresenta uma coloração mais escura e com a presença de antenas e o aparelho bucal é do tipo triturador. O corpo é recoberto por cerdas que variam de forma de acordo com a espécie. Na fase pupal, o inseto passa a apresentar 13 segmentos, os quatro primeiros formando o cefalotórax e os nove restantes constituem o abdômen. As pupas mantêm-se fixas em um substrato. São de coloração esbranquiças e tornam-se escuras na medida em que se aproximam da fase adulta. Todo o ciclo de desenvolvimento do inseto dura em média de 30 a 60 dias, variando de acordo com a espécie. Os adultos vivem em uma faixa de temperatura média entre 20ºC e 30ºC e necessitam de umidade elevada e de proteção contra intempéries (FORATTINI, 1973; BRAZIL e BRAZIL, 2003; MARCONDES, 2011).

1.5 COMPLEXO *Lutzomyia longipalpis*

Um complexo de espécies pode ser definido como um conjunto de espécies que apresentam caracteres morfológicos externos indistinguíveis, no entanto, se diferenciam em relação aos aspectos genéticos, comportamentais e químicos (BICKFORD et al., 2006).

Mangabeira (1969) identificou uma variação morfológica em machos de *Lu. longipalpis*, representada por um polimorfismo em relação à quantidade de manchas claras nos tergitos abdominais. Essa diferenciação se deu através de observações feitas em machos coletados no estado do Ceará, os quais apresentavam duas manchas claras no terceiro e quarto tergito - fenótipo (2S), e em machos coletados no estado do Pará, com apenas uma mancha clara presente no quarto tergito - fenótipo (1S), sugerindo, assim, que *Lu. longipalpis* fosse um complexo de espécies devido aos fenótipos e condições ecológicas distintas. Um terceiro fenótipo foi identificado e classificado como forma intermediária (INS), caracterizado pela presença da mancha de tamanho variável no terceiro tergito, e a mancha no quarto tergito de tamanho aproximado aos dos outros fenótipos (SPIEGEL et al., 2016).

LANE e WARD (1984) demonstraram, através de microscopia eletrônica de varredura, a presença de papilas cuticulares com poros centrais nas manchas claras, sugerindo que estes fossem o local de liberação de feromônios. A formação das manchas, onde as estruturas disseminadoras de feromônios foram localizadas, começa na fase de pupa, porém o padrão de manchas não está relacionado com o tipo de feromônio produzido (WARD et al., 83;88; SPIEGEL, 2002).

Análises químicas desses feromônios sugerem que *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies, formado por quatro quimiotipos. O quimiotipo 1 ou (S)-9-metilgermacreno-B encontra-se presente no Brasil, nos estados de: Ceará (WATTS et al., 2005), Goiás (SPIEGEL et al., 2016), Maranhão (SPIEGEL et al., 2016), Mato Grosso do Sul - tanto em *Lu. longipalpis* (SANTOS et al., 2013) quanto em *Lutzomyia cruzi* (WATTS et al., 2005; BRAZIL et al., 2002), Minas Gerais (HAMILTON et al., 1996; 2005; WATTS et al., 2005), Piauí (ARAKI et al., 2009), Rio de Janeiro (ARAKI et al., 2009), São Paulo (CASANOVA et al., 2015) e Tocantins (BRAZIL et al., 2010). Em outros países da América do Sul, também como Bolívia (encontrado em *Lu. cruzi*) (SPIEGEL et al., 2016), Colômbia (HAMILTON e WARD, 1991), Honduras (HAMILTON et al.,1996), Paraguai (BRAZIL et al., 2009) e Venezuela (WATTS et al., 2005).

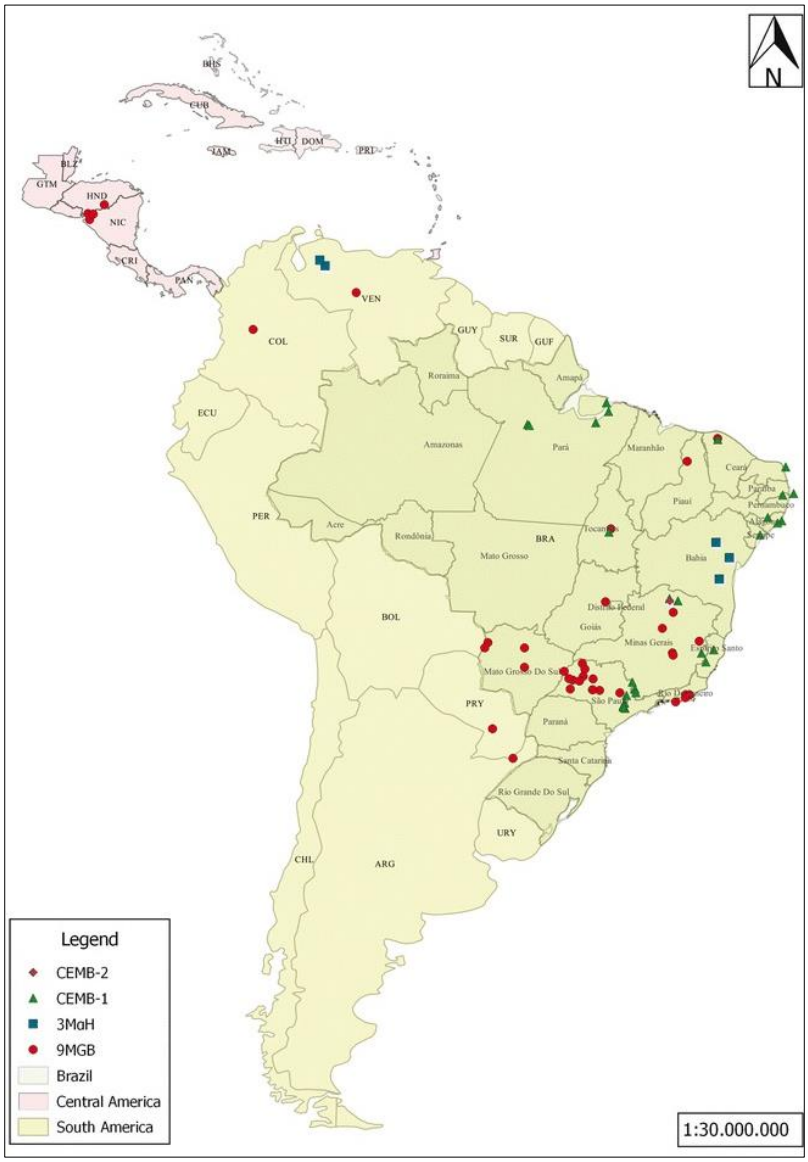
O quimiotipo 2 ou 3-metil-α-himachaleno encontra-se no Brasil restrito ao estado da Bahia, no município de Jacobina (HAMILTON et al., 1994; 1999), e na Venezuela na espécie *Lutzomyia pseudolongipalpis* (ARRIVILAGA e FELICIANGELI, 2001; WATTS et al., 2005).

O quimiotipo 3 ou cembreno-1 é encontrado no Brasil nos estados de Alagoas, Ceará (HAMILTON et al., 2005), Espírito Santo (ARAKI et al., 2009), Pará (WATTS et

al., 2005), Pernambuco (SPIEGEL et al., 2016), Minas Gerais (HAMILTON et al., 2004), São Paulo (CASANOVA et al., 2015), Sergipe (SPIEGEL et al., 2016), Tocantins (BRAZIL et al., 2010) e Rio Grande do Norte (WATTS et al., 2005).

O quimiotipo 4 ou cembreno-2 é encontrado somente no estado de Minas Gerais (HAMILTON et al., 2004).

Figura 2 - Localização geográfica dos diferentes quimiotipos encontrados em *Lu. longipalpis*

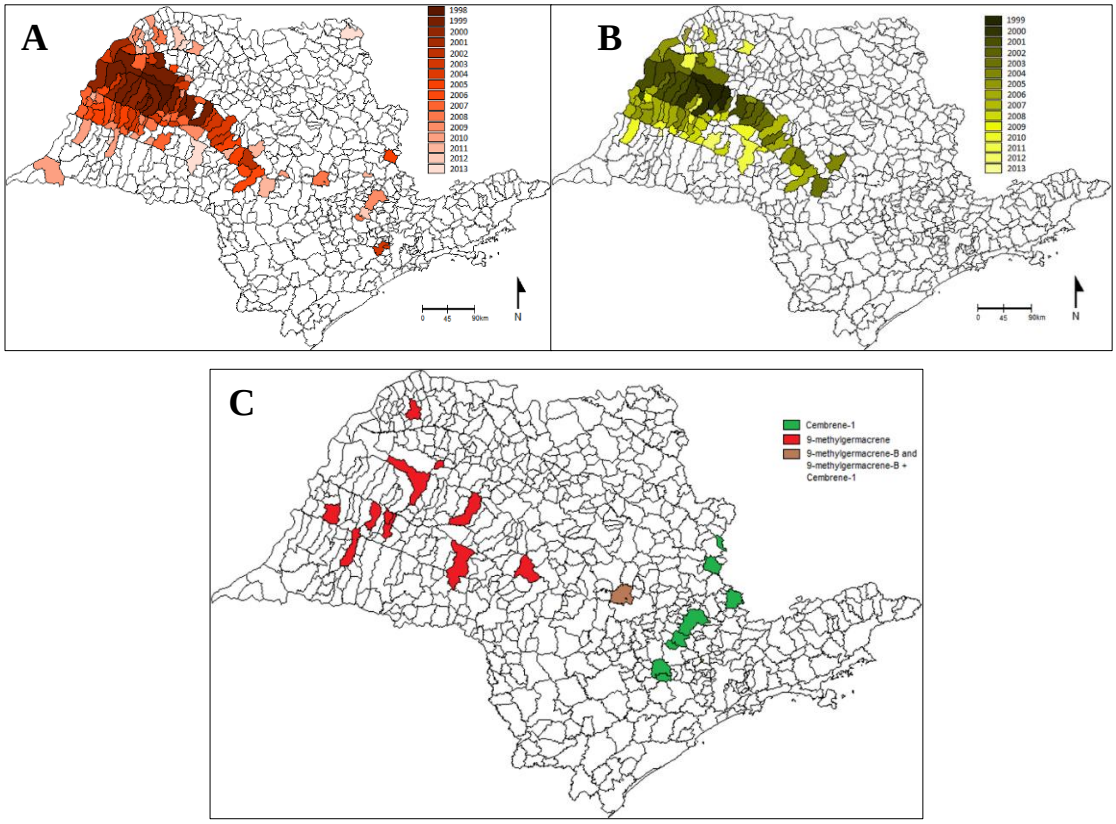


Fonte: Spiegel e colaboradores (2016)

Na Região Nordeste do Brasil, a população cembreno-1 é abundante, e sua localização é concomitante com os registros de casos de LVA em humanos, enquanto a

população (S)-9-metilgermacreno-B está restrita a algumas localidades. Já no estado de São Paulo, a situação é inversa, a população (S)-9-metilgermacreno-B é abundante e predominante na região oeste do estado, concomitante com os registros de casos LV em cães e humanos, enquanto que a população cembreno-1 é encontrada na região leste do estado, onde não há registros de casos de LV em humanos (Figura 3). Essas diferenças nos perfis epidemiológicos sugerem que existem diferenças na capacidade vetorial de ambas as populações de espécies (HAMILTON, 2005; CASANOVA et al., 2006; 2015).

Figura 3 - Distribuição de casos de LV pelo estado de São Paulo compreendendo o período de 1998-2013: (A) para os casos caninos, (B) para os casos humanos. (C) Distribuição geográfica das diferentes populações *Lu. longipalpis.*



Fonte: Casanova e colaboradores (2015).

Populações que apresentam padrões de manchas diferentes e feromônios iguais são capazes de copular e gerar indivíduos férteis, no entanto, quando a cópula ocorre com indivíduos quimiotipos distintos não é possível de se obter o mesmo resultado, devido à falta da transferência do esperma durante a cópula, demonstrando que o tipo de feromônio

produzido é um dos caracteres mais relevantes para a separação das espécies do complexo. (WARD et al., 1983;1988).

1.6 LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA (LVF)

O primeiro registro de leishmaniose felina em gato doméstico ocorreu na Argélia, em 1912, sendo que o mesmo vivia com um cão e uma criança ambos afetados pela doença, e formas amastigotas foram encontradas na medula óssea do animal. Porém, a espécie causadora da enfermidade não fora identificada (SERGENT et al.,1912). Desde então, vários registros de LVF causadas por *Le. infantum* foram feitos em vários países: Brasil (SAVANI et al., 2004; SILVA et al ., 2010; MENDONÇA et al., 2017), Espanha (LEIVA et al ., 2005; HERVAS et al., 1999), França (OZON et al., 1998; GREVOT et al., 2005; POCHOLLE et al ., 2012), Itália (PENNISI et al., 2002; POLI et al., 2002; MAROLI et al., 2007) e Portugal (MARCOS et al ., 2009; MAIA et al., 2010).

O primeiro caso de infecção natural por leishmânia em felinos no Brasil foi registrado no ano de 1939, no município de Aurá, estado do Pará, mas a espécie causadora da infecção também não foi identificada (MELLO, 1940). Em 2001 foi registrado o primeiro caso autóctone de LVF nas Américas, no estado de São Paulo, na cidade de Cotia (SAVANI et al., 2004).

Pouco se conhece quanto à competência de gatos como fontes de infecção de *Le. infantum* para os flebotomíneos. A transmissibilidade do parasita de um gato foi descrita pela primeira vez através de xenodiagnóstico realizado na Itália, no qual se utilizou a espécie *Phlebotomus perniciosus.* Neste estudo um felino diagnosticado com LVF (Leishmaniose Visceral Felina) por *Le. infantum,* foi exposto a 100 fêmeas de flebótomos das quais 19 se alimentaram e quatro apresentaram infecção pelas formas promastigotas (21%) (MAROLI et al., 2007). No Brasil, o mesmo tipo de experimento foi realizado em Belo Horizonte. Desta vez, utilizando fêmeas de *Lu. longipalpis*, alimentando-se em um gato. Das 84 fêmeas que se alimentaram, onze (13,1%) apresentaram positividade de infecção por *Le. infantum*. Segundo esses achados, os gatos podem ser considerados reservatórios suspeitos do parasita em áreas endêmicas (SILVA et al., 2010), e infecção em gatos têm sido relatadas em várias partes do mundo. No entanto, a participação do mesmo como reservatório do parasita ainda não foi esclarecida por completo (LONGONI et al., 2012), sendo necessária a avaliação do seu papel epidemiológico na transmissão da LV.

Gatos infectados podem apresentar sinais clínicos semelhantes aos dos cães, tais como: linfoadenomegalia, dermatites, alopecia difusa, emaciação, anorexia, porém, o quadro clínico é inespecífico, sendo muitas vezes as lesões cutâneas como a dermatite ulcerativa, presente geralmente na cabeça e pescoço a manifestação clínica mais frequente e talvez um dos únicos sinais encontrados no exame clínico (PENNISI et al., 2013). Mesmo sendo suscetíveis à infecção, os felinos podem apresentar uma resistência natural a leishmaniose, sendo a infecção associada a doenças que causam imunossupressão, tais como FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) e FELV (Vírus da Leucemia Felina), o que explicaria o fato dos felinos apresentarem-se em menor número de animais infectados e com sinais clínicos para LVF. Fazendo com que muitos animais sejam diagnosticados somente quando apresentam sinais clínicos.

O diagnóstico laboratorial é feito através de exames parasitológicos-citologia ou cultivo do parasita, imunológicos-Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e moleculares através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MS, 2017).

Por ser uma doença subnotificada se faz necessário inquéritos sorológicos em áreas endêmicas para a possível detecção de animais doentes, para que medidas de controle possam ser tomadas (SIMÕES-MATTOS et al., 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A LV é considerada uma doença emergente no estado de São Paulo e tem apresentado aumento no número de casos humanos, associado a vários fatores, incluindo a dispersão do vetor *Lu. longipalpis* e o aumento da prevalência canina, entre outros.

Das quatro populações do complexo *Lu. longipalpis* presentes no Brasil, duas são encontradas no estado de São Paulo: (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1(CASANOVA et al., 2015)

Análises químicas realizadas em machos coletados em 12 municípios da região oeste (Araçatuba, Adamantina, Bauru, Dracena, Jales, Lourdes, Marília, Oswaldo Cruz, Panorama, Presidente Prudente, Promissão e Salmourão) evidenciaram a presença do feromônio (S)-9-metilgermacreno-B, enquanto que em oito municípios da região leste (Águas da Prata, Campinas, Indaiatuba, Espírito Santo do Pinhal, Salto, Socorro, Sorocaba e Votorantim) apenas de cembreno-1.

As duas populações acima descritas apresentam perfis epidemiológicos distintos, (S)-9-metilgermacreno-B está presente em municípios caracterizados pela elevada incidência de casos de LV em cães e humanos, enquanto que na região leste do estado, onde a população cembreno-1 se encontra, não há casos de LV em humanos, o que sugere que a capacidade vetorial dessas duas populações seja diferente. (CASANOVA et al., 2006; CASANOVA et al., 2015; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Para que uma espécie seja classificada como vetora de um patógeno ao homem existem alguns critérios a serem atendidos, sendo a antropofília um dos mais imprescindíveis para tal incriminação, juntamente com a caracterização da mesma espécie de parasita em humanos e também no vetor, outros critérios também são levados em conta, tais como: distribuição geográfica da espécie do vetor coincidente com a da distribuição da doença, hábito alimentar incluindo os reservatórios do agente causal da doença, desenvolvimento maciço de formas infectantes no intestino do vetor e que essas formas infectantes sejam transmitidas através da picada (KILLICK- KENDRICK,1990). *Lutzomyia longipalpis* se enquadra em todos os critérios, porém, aspectos da capacidade vetorial podem variar entre populações dessa espécie, tais como o tempo de desenvolvimento dos imaturos, a susceptibilidade para se infectar e permitir o desenvolvimento das formas de *Le. infantum*, entre outros. Por isto, a obtenção de culturas dessas populações em condições de laboratório se faz necessária para contribuir com

conhecimentos dos aspectos biológicos e para fins de avaliar possíveis diferenças no potencial vetor dessas populações.

Pouco se sabe sobre a LVF e a competência do gato doméstico como fonte de infecção de *Le. infantum* para flebotomíneos, recentemente, apenas dois estudos foram feitos nesse sentido, ambos comprovando o gato como competente para transmissão de *Le. infantum* (MAROLI et al., 2007; SILVA et al., 2010). Acredita-se que os gatos possam atuar como reservatório de leishmânias em áreas endêmicas para LVA, principalmente, onde esses animais são abundantes. Assim, a detecção de *Le. infantum* nesses animais em área urbana, pode reforçar a ideia de que os felinos domésticos participam na manutenção do parasita nesse ambiente (ALVES-MARTIN et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos ecológicos relacionados ao potencial vetor de duas populações do complexo *Lu. longipalpis*, (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1, em se infectar por *Le. infantum* na natureza, em modelo artificial, e para a população (S)-9-metilgermacreno-B em modelo animal com gatos comprovadamente infectados por *Le. infantum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a infecção natural das populações (S)-9-metilgermacreno- B e cembreno-1 nas respectivas áreas de ocorrência;
- Comparar a susceptibilidade à infecção com *Le. infantum* das duas populações de *Lu. longipalpis;*
- Comparar a intensidade de infecção experimental entre as duas populações de *Lu. longipalpis* em modelo artificial;
- Investigar a susceptibilidade à infecção de *Lu. longipalpis* (população (S)-9-metilgermacreno-B) quando alimentadas em gatos domésticos (*Felis catus*) infectados naturalmente por *Le. infantum.*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA

Os espécimes parentais foram obtidos através de coletas realizadas por busca ativa em abrigos de animais domésticos e armadilhas luminosas do tipo CDC, nos municípios de Dracena e Valinhos. Estes municípios foram selecionados pela presença das duas populações do complexo *Lu. longipalpis* (CASANOVA et al., 2015). Dracena é um município situado na região Oeste do estado de São Paulo (21°28’58”S e 51°31’58”O), na região administrativa de Presidente Prudente, fazendo divisa com os municípios de Piquerobi, Ribeirão dos Índios, Junqueirópolis, Tupi Paulista, Presidente Venceslau e Ouro Verde (Figura 4).

Figura 4 - Localização do município de Dracena, estado de São Paulo.

Fonte: Google Maps, 2019.

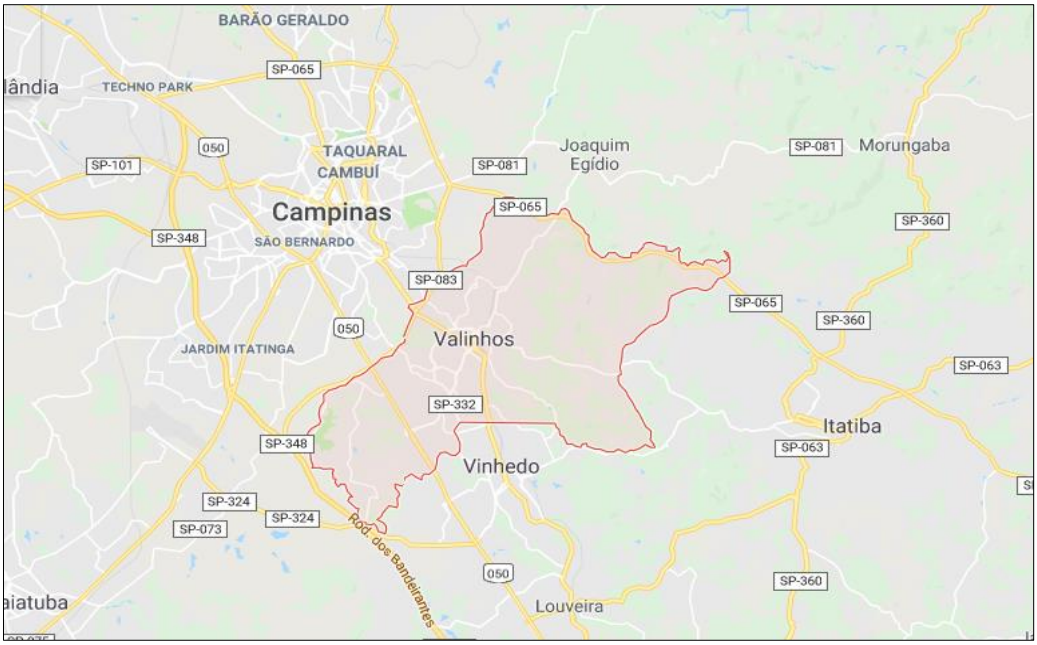
Com uma área de 488,401 km² e uma população estimada de 46,536 habitantes, tem seu território pertence ao bioma de Mata Atlântica (IBGE, 2017). Apresenta temperatura média anual entre 12°C e 35ºC, e estação chuvosa entre outubro e março com inverno seco. De acordo com a classificação de Köopen-Geiger o clima é tropical com inverno seco (PEEL, 2007). A presença de *Lu. longipalpis* nesta localidade foi registrada pela primeira vez em 2003, e transmissão da LV canina e humana desde o ano de 2005 (D’ANDREA et al., 2009). Nesta localidade tem sido descrita a presença da população (S)-9-metilgermacreno-B do complexo *Lu. longipalpis* (CASANOVA et al., 2015). As

capturas foram realizadas das 18:00 e 22:00 horas, em uma residência situada no bairro Jardim Jussara, localizado na área urbana (Figura 5), por meio da busca ativa em abrigos de animais domésticos, com auxílio de capturador de Castro. Adicionalmente foram realizadas capturas com armadilha do tipo CDC, instaladas nos abrigos de animais domésticos entre 18:00 e 08:00 horas.

Figura 5 - Imagens do local de captura peridomicílio no município de Dracena: (A) visão externa; (B) visão interna.

Valinhos situa-se na região leste do estado de São Paulo, 22°58’14”S e 46°59’45”O, na região Metropolitana de Campinas, fazendo divisa com os municípios de Campinas, Itatiba, Itupeva, Morungaba e Vinhedo (Figura 6). Com uma área de 148,538 km², apresenta população estimada em 124.024 habitantes, tendo como temperatura média anual entre 15°C e 21 ºC e, estação chuvosa entre outubro e março, pertencendo ao bioma de Mata Atlântica (IBGE, 2017). De acordo com a classificação de Köopen-Geiger o clima é subtropical úmido (PEEL, 2007). O município foi escolhido pela presença comprovada da população cembreno-1 do complexo *Lu. longipalpis* (CASANOVA et al., 2015), com transmissão comprovada de LVC (HIRAMOTO et al., 2019).

Figura 6 - Localização do município de Valinhos, estado de São Paulo.



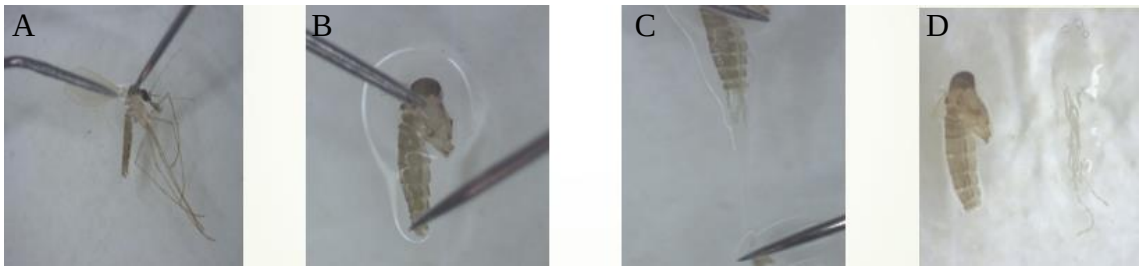
Fonte: Google Maps, 2019

No município de Valinhos, as coletas foram realizadas em três localidades, uma residência localizada no bairro Parque Valinhos, uma fazenda e um condomínio localizados no Bairro Nova Suíça, totalizando quatro coletas, todos os locais caracterizados por presença de galinheiros e mata residual (Figura 7). As capturas foram realizadas por busca ativa com auxílio de capturador de Castro, entre 18:00 e 22:00 horas, e com armadilha do tipo CDC entre 18:00 e 08:00 horas, totalizando 14 horas de captura.

Figura 7 - Imagem da paisagem de um dos locais de captura no município de Valinhos: (A) visão externa; (B) visão interna.

Uma amostra das fêmeas capturadas para obtenção de espécimes de primeira geração das duas populações objeto de estudo foi dissecada para investigar a presença de flagelados de *Leishmania*. spp. O processo de dissecção das fêmeas (Figura 8) consistiu na retirada do trato digestório para a observação em microscópio óptico. Para isto as fêmeas foram colocadas sobre uma lâmina contendo uma gota de solução salina (0,9%). A dissecação iniciou com a retirada das asas, patas e cabeça. A seguir, para a retirada do intestino, um estilete foi apoiado no tórax e com o outro foi realizado um corte nos últimos segmentos abdominais, então, o intestino foi extraído puxando cuidadosamente o estilete situado na parte final do abdômen até que todo o trato digestório estivesse totalmente exposto. Todo esse processo foi realizado sob um microscópio estereoscópio com um aumento de 60x. Após a exposição, a amostra foi coberta com lamínula e o conteúdo observado em microscópio óptico, ao aumento de 400x.

Figura 8 - Etapas para dissecção de fêmeas de flebotomíneos. A: Retirada das asas, patas e cabeça; B: posicionamento da fêmea com um estilete no tórax e outro na porção final do abdome; C: exposição total do intestino e D: Fêmea pronta para observação em microscópio para investigação de formas flageladas.



As fêmeas que se apresentaram negativas foram agrupadas em pools segundo data e local de captura. As fêmeas que apresentaram flagelados foram armazenadas individualmente, em um microtubo contendo álcool isopropílico. As amostras foram analisadas para a identificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. mediante reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Está análise foi realizada em parceria com o Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Aplicada (LMVPA) na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga, São Paulo.

Os seguintes procedimentos foram realizados:

4.2.1 Extração de DNA

As amostras de fêmeas de flebotomíneos foram submetidas a extração de DNA segundo protocolo de Bruford e colaboradores (1998), como descrito em Galvis-Ovallos e colaboradores (2017).

As amostras armazenadas em álcool isopropílico foram centrifugadas a 14.000 RPM durante 15 minutos a 10º C. Após a centrifugação, o álcool foi removido por pipetagem seguido de incubação em banho seco a 56º C por 15 minutos. Em seguida, as fêmeas foram maceradas em 50µL de Digsol Buffer com o auxílio de pistilos estéreis. Com o conteúdo totalmente macerado, adicionou-se 20 mL de Proteinase K em cada amostra e homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos. As amostras permaneceram então em banho seco a 37°C overnight. Depois desse período, adicionou-se 400mL de Acetato de Amônio 4M e homogeneizou-se em vórtex por 15 minutos. Centrifugou-se a 14.000 RPM durante 15 minutos a 10°C, e em seguida o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Ao conteúdo foi adicionado 1000 mL de Álcool Absoluto seguido de centrifugação a 14.000 RPM durante 15 minutos a 10°C e sobrenadante removido. Uma segunda lavagem foi realizada de mesmo modo com 900 mL do Álcool 70% (gelado). Os microtubos foram invertidos em papel absorvente durante 15 minutos e logo após foram incubados em banho seco a 56º C por 15 min, para que houvesse a evaporação completa do álcool. As amostras foram incubadas a 54°C em banho seco por 15 minutos com 50 mL de Água Ultrapura para eluição do DNA. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20ºC até o momento do uso.

4.2.2 PCR

Para confirmação do processo de extração de DNA, as amostras foram submetidas a PCR para o gene endógeno IVS6 que apresenta um produto de 220 pares de base (pb), descrito por LINS e colaboradores (2002). A detecção de fragmentos de *Leishmania* spp. foi realizada usando primers que amplificam o gene 13A/13B, descrito por RODGERS e colaboradores (1994). As amostras de fêmeas de campo positivas para a PCR anterior, foram ainda, submetidas a PCR com primers que amplificam a região do *Internal Transcribe Spacer* 1 (ITS-1) descrito por EL TAI. (2002) seguido de sequenciamento genético. Como controle positivo foi utilizado DNA de *Lu. longipalpis* para a PCR de

gene endógeno e DNA de *Leishmania amazonensis* para a PCR de infecção por *Leishmania* spp. Para todas as reações, água ultrapura autoclavada foi utilizada com controle negativo. Ao fim, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (gene ITS-1) a 2% (genes IVS6 e 13A/13B) e corados com SYBER safe (Invitrogen) a 100V durante 60 minutos.

4.2.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado somente nas amostras de fêmeas confirmadas como infectadas por exame parasitológico e molecular para identificação da espécie de *Leishmania* spp. Os amplificados foram purificados com kit comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados para o Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Células-Tronco – IB – USP. Os eletroferogramas foram analisados pelos softwares Chromas e BioEdit. As sequências foram então comparadas no programa BLAST (GenBank).

4.3 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SUSCEPTIBILIDADE DAS DUAS POPULAÇÕES DE *Lu. longipalpis* À INFECÇÃO POR *Le. Infantum*

Para avaliação comparativa da susceptibilidade das duas populações de *Lu. longipalpis* à infecção com *Le. infantum* os seguintes procedimentos metodológicos foram realizados.

4.4 CULTIVO DAS POPULAÇÕES DO COMPLEXO *Lu. longipalpis* EM LABORATÓRIO

O cultivo de *Lu. longipalpis* foi mantido no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae, na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. As janelas do laboratório são vedadas, há uma cortina de ar na porta que antecede a sala de cultivo e armadilhas do tipo CDC ficam permanentemente ligadas para evitar a fuga de formas aladas de dentro do insetário. A técnica empregada no cultivo em laboratório foi baseada na metodologia adaptada de Killick-Kendric e Killick-Kendric (1991) e descrita em Galvis-Ovallos (2011)

4.4.1 Alimentação das fêmeas

As fêmeas parentais foram alimentadas em codornas (*Coturnix coturnix*), anestesiadas por injeção intramuscular com quetamina e cloridrato de xilazina, de acordo ao peso, e expostas por um tempo de 60 minutos (Figura 9).

Figura 9 - (A) Imagem das gaiolas utilizadas para a manutenção dos flebótomos durante a alimentação sanguínea; (B) Imagem ilustrativa do repasto sanguíneo de fêmeas de *Lu. longipalpis* em codorna.

4.4.2 Individualização das fêmeas

Após o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas foram individualizadas em tubos de acrílico (35,5 mm de altura x 26,7 mm de diâmetro) com fundo revestido em gesso (Figura 10) e ofertou-se uma solução açucarada (10%) ou um pedaço de maçã como fonte energética para a manutenção, até que a oviposição fosse realizada. Após a oviposição, os machos e as fêmeas provenientes de campo foram clarificados, de acordo com o método descrito em Forattini (1973), e identificados segundo Galati (2017).

Figura 10 - Imagem do recipiente de acrílico utilizado para individualização de fêmeas pós alimentação sanguínea.

Uma vez selecionadas as populações de estudo, as fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em recipientes plásticos (10,0 cm de altura x 10,0 cm de diâmetro) também com fundo de gesso (Figura 11), agrupando entre 40 e 50 para seu cultivo em massa. Os recipientes foram mantidos em contato com areia umedecida para a manutenção da umidade até que ocorresse a oviposição.

Figura 11 - Imagem do recipiente de acrílico utilizado para agrupamento de fêmeas pós alimentação sanguínea.

4.4.3 Transferência de ovos, alimentação das larvas e seguimento das formas imaturas

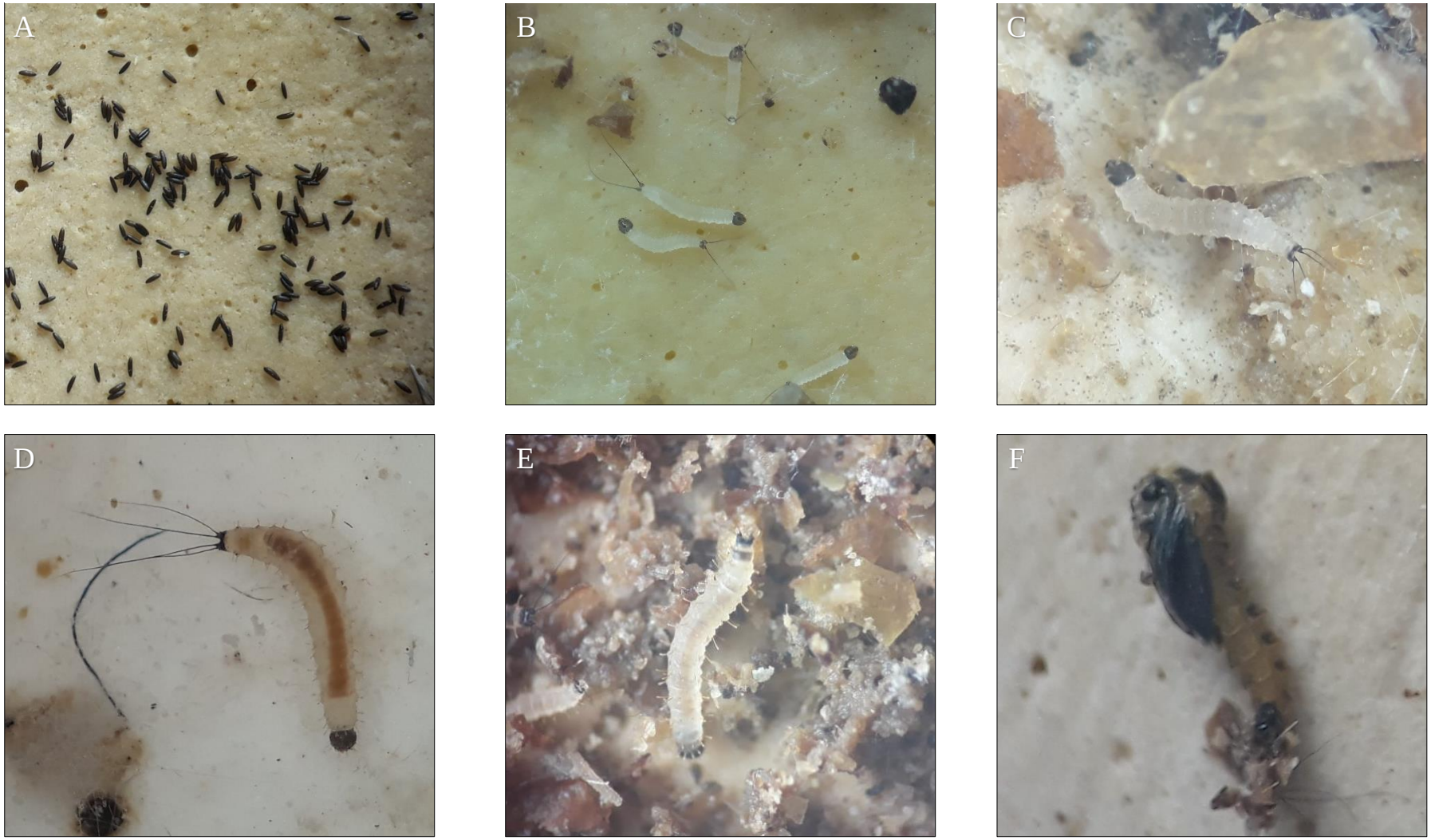
Os ovos foram transferidos, com o auxílio de um pincel de ponta fina, para recipientes plásticos com fundo de gesso no qual as larvas foram mantidas até a emergência dos adultos. Os potes de criação das formas imaturas foram mantidos no

interior de caixas plásticas com o fundo coberto com areia fina (Figura 12), para a manutenção da umidade, e estas armazenadas no interior de caixas térmicas.

Figura 12 - Imagem do sistema utilizado para a manutenção das formas imaturas de *Lu. longipalpis.*

As formas imaturas foram acompanhadas diariamente para o acompanhamento de seu desenvolvimento, bem como para o controle da umidade e alimento no interior dos potes. A descrição dos estádios larvais de *Lu. longipalpis* está representada na figura 13.

Figura 13 - Ciclo de desenvolvimento das formas imaturas de *Lu. longipalpis* observado em microscópio estereoscópio. (A) ovos; (B) larva de 1º estádio (L_1); (C) larva de 2ºestádio (L_2); (D) larva de 3ºestádio (L_3); (E) larva de 4º estádio (L_4) e (F) pupa.



4.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM MODELO ARTIFICIAL:

4.5.1 Preparo do sangue contendo parasitos

Um tubo com heparina contendo sangue humano foi centrifugado a 2.000 rpm a 4º C por 15 minutos para separar o plasma das hemácias. O plasma foi transferido para um tubo de Falcon de 15 mL, e colocado em banho-maria por 1 hora, para a inativação das proteínas do sistema complemento. As hemácias foram lavadas com PBS pH 7,2 e centrifugadas e a 2.500 rpm por 8 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi feito 3 vezes. Após a inativação do plasma e lavagem das hemácias, ambos foram colocados juntos novamente.

O material da cultura de *Le. infantum* foi obtido no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). Os parasitos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 5 mL de solução PBS (pH 7,2), foi feita a centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante (processo realizado 2 vezes). O pellet foi ressuspendido em 300 µL de PBS (pH 7,2). Para a contagem de parasitos 10 µL da cultura foram diluídos em 90 µL de formalina (1:10) em um microtubo, dessa diluição 10 µL foram transferidos para outro microtubo contendo 90 µL de formalina para se obter uma concentração de 1:100, para a contagem de parasitos pipetou-se 10 uL da diluição (1:100) , a contagem foi realizada em câmara de Newbauer.

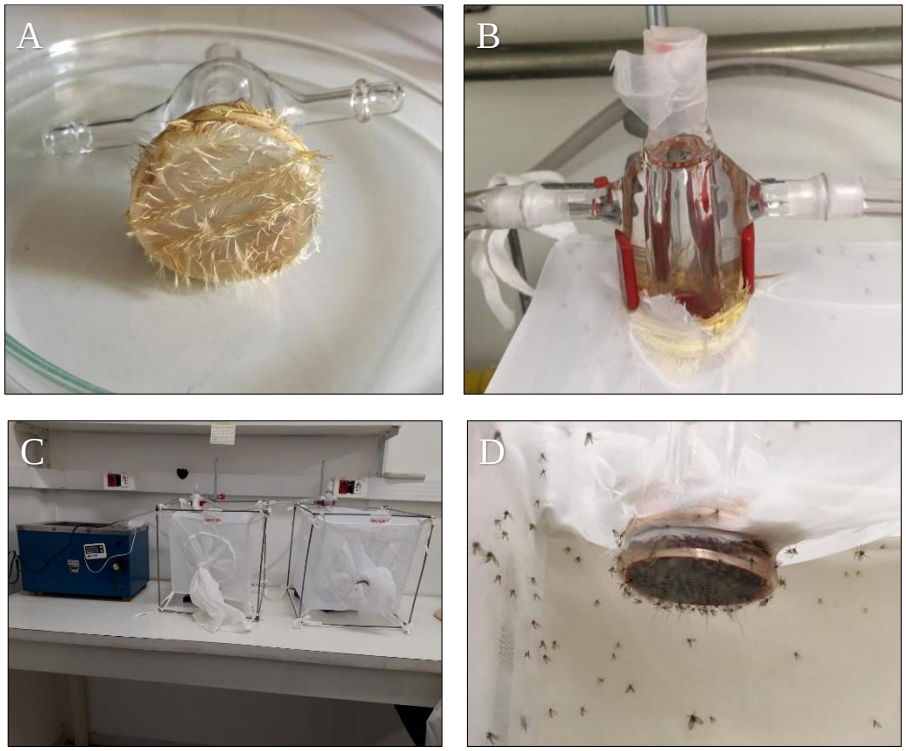
Utilizou-se a concentração final de $1x10^6$ parasitos para 1mL de sangue como descrito em MYSKOVA e colaboradores (2007).

4.5.2 Sistema de alimentação em membrana

O sistema de alimentação artificial (Figura 14), consiste em um funil de vidro invertido com dois compartimentos: um central, onde fica armazenado o sangue contendo os parasitas, e outro circundando o compartimento central, no qual ocorre a passagem de água. Nesse compartimento, existem duas aberturas ligadas a duas mangueiras de silicone conectadas a um banho-Maria, e uma bomba de aquário, que permite a circulação da água, mantendo o sangue aquecido entre 35ºC e 37ºC no compartimento central. A parte

inferior do compartimento central é coberta com uma membrana de pele de pintinho (*Gallus gallus domesticus*), simulando assim a presença de um hospedeiro.

Figura 14 - Imagem ilustrativa do sistema de alimentação artificial para fêmeas de flebotomíneos. (A) Membrana de pele de pintinho colocada no alimentador artificial. (B) Destaque para o alimentador encaixado na gaiola com flebotomíneos. (C) Sistema de alimentação artificial. (D) Destaque para as fêmeas se alimentando no sistema de membranas.



Após a alimentação, as fêmeas foram individualizadas e mantidas nas mesmas condições de cultura. No quinto dia, as fêmeas de cembreno-1 e (S)-9-metilgermacreno-B foram dissecadas para a investigação da presença de formas flageladas, e no oitavo somente as fêmeas de cembreno-1, pois as fêmeas de (S)-9-metilgermacreno-B não sobreviveram até o oitavo dia. A estimativa do número de parasitas foi realizada *in situ.* Para isto as fêmeas foram anestesiadas por 5 minutos em freezer e dissecadas em uma gota de solução salina (Figura 8). O número de parasitas foi estimado em microscópio ótico a 200X e 400X. A carga de parasitas foi graduada em quatro categorias: negativa (-) sem presença de flagelados), fraca (+) 1-50 parasitos, moderada (++) 51-100 parasitos, forte (+++) 101-200 e intensa (++++) > 200 parasitos, de acordo com Travi e colaboradores (2001).

4.6 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE *Lu. longipalpis* ALIMENTADAS EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) INFECTADOS NATURALMENTE POR *Le. infantum*

Para a realização do xenodiagnóstico em gatos foram utilizadas fêmeas com idade entre 3-5 dias, cultivadas em laboratório como descritas anteriormente.

4.6.1 Exposição dos gatos infectados por *Le. infantum* (População (S)-9-metilgermacreno-B)

O procedimento foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia (LIPAS) da Universidade Estadual Paulista -UNESP de Ilha Solteira. O xenodiagnóstico foi realizado em cinco gatos (*Felis catus*), todos provenientes do município de Ilha Solteira -SP, e com diagnóstico confirmado de leishmaniose através dos testes sorológicos: ELISA e RIFI, moleculares: cPCR e qPCR e parasitológico: citologia de linfonodo. Os cinco gatos foram avaliados para FIV e FeLV por meio do Kit (*Feline Leukemia Virus Antig-Feline / Immunodeficiency Virus Antibody Test*, REF 99-08354, Lot MM813), produzido pela IDEXX Laboratories, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA.

A Tabela apresenta a descrição da avaliação clínica dos gatos utilizados no experimento.

Tabela 1 - Avaliação clínica dos gatos com *Le. infantum* utilizados no experimento.

Gatos	Sinais clínicos
1	Lesões: (orelhas e corpo), alopecia e linfonodo hipertrofiado
2	Lesões no corpo e alopecia
3	Lesões: (rosto, orelhas) e alopecia
4	Sem sinais clínicos
5	Sem sinais clínicos

Fonte: OLIVEIRA et al., 2018.

Os gatos foram sedados com uma dose de 11mg de Telazol + 2mg de tramadol via intramuscular e, posteriormente, individualizados em gaiolas medindo 50x30x30, e

após um período de 10 minutos, foram expostos às fêmeas de *Lu. longipalpis* (população (S)-9-metilgermacreno-B) (Figura 15). Após uma hora de exposição, os gatos foram retirados das gaiolas e contabilizado o número de fêmeas ingurgitadas, as quais foram retiradas com o auxílio de um capturador de Castro e colocadas em um recipiente com fundo de gesso umedecido e um suporte de papel filtro. Um pedaço de maçã foi ofertado como suprimento de açúcar e água manutenção.

Figura 15 - Imagem ilustrativa do procedimento para exposição dos gatos no xenodiagnóstico (A e B) Imagens mostrando as lesões em um gato. (C) Gaiola utilizada para realização do xenodiagnóstico. (D) Gato sedado em momento de exposição às fêmeas de *Lu. longipalpis.*

Foto: Geovanna Vioti, 2018.

Posteriormente, os flebotomíneos foram transportados ao LESP/Phlebotominae da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em recipientes lacrados, onde permaneceram no interior de uma bolsa térmica para a manutenção de umidade e temperatura até o momento da dissecção. A dissecção das fêmeas foi realizada conforme descrita anteriormente. As fêmeas foram dissecadas na medida que iam morrendo. Porém, no segundo experimento, as fêmeas que ainda estavam vivas no sétimo dia foram eutanasiadas e dissecadas (Figura 8). Isto com o intuito de descartar a não observação de flagelados nas amostras pelo tempo decorrido entre a morte da fêmea e dissecção.

4.6.2 Análise de dados

A taxa de infecção natural das fêmeas de flebotomíneos foi estimada como o número de fêmeas com flagelados entre o total de fêmeas dissecadas. A comparação da susceptibilidade das duas populações foi realizada pelo teste de chi-quadrado. Medidas tendência central foram utilizadas para descrever o número de fêmeas expostas por gato nos experimentos de xenodiagnóstico.

5. RESULTADOS

5.1 INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL POR *Le. infantum* nas populações (S)-9 metilgermacreno-B e cembreno-1 de *Lu. longipalpis*

Uma amostra das fêmeas capturadas nas coletas realizadas para a obtenção de espécimes de primeira geração foi dissecada como tentativa para detectar a circulação de *Leishmania* spp. nas áreas onde as populações ocorrem.

No município de Dracena foram realizadas três coletas entre junho e outubro de 2018, com um total de 169 fêmeas capturadas. Dessas fêmeas, uma amostra representada por 32 fêmeas capturadas no mês de outubro foram dissecadas (Tabela 2), Porém, não foram observados flagelados no tubo digestivo. As fêmeas dissecadas foram submetidas a exame molecular por PCR e não foram detectados fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. (Figura 18).

Tabela 2 - Descrição das capturas realizadas no município de Dracena-SP, junho - outubro de 2018, segundo data e quantidade de fêmeas dissecadas.

Captura	Data	Nº fêmeas de *Lu. longipalpis* coletadas	Nº de fêmeas dissecadas	Fêmeas com parasitológico positivo
1	Jun/2018	24	NR	NR
2	Jun/2018	30	NR	NR
3	Out/2018	115	32	0
Total:		169	32	0

Legenda: NR- não realizado.

No município de Valinhos foram realizadas quatro coletas, entre abril e dezembro de 2018, sendo capturadas 57 fêmeas de *Lu. longipalpis*. Destas, somente foram dissecadas as fêmeas coletadas no condomínio (47 fêmeas), devido à presença de cães comprovadamente infectados no local de captura. Das 47 fêmeas, duas apresentaram flagelados no intestino (Figura 16). As duas amostras positivas foram armazenadas individualmente e as 45 restantes agrupadas em quatro pools. A presença de *Le. infantum*

foi corroborada pela amplificação de fragmento de DNA e sequenciamento. Portanto, estima-se uma taxa de infecção natural de 4,2% pelos exames parasitológico e molecular. Embora, outras espécies de flebotomíneos tenham sido capturadas nesta área (Tabela 3), somente as fêmeas de *Lu. longipalpis* foram dissecadas.

Figura 16 - Presença de aglomerados de flagelados (indicados pela seta) no exame parasitológico positivo para *Le. infantum* (A) Região da válvula estomodeal. (B) Região do intestino médio torácico. (C) Região do intestino médio abdominal.

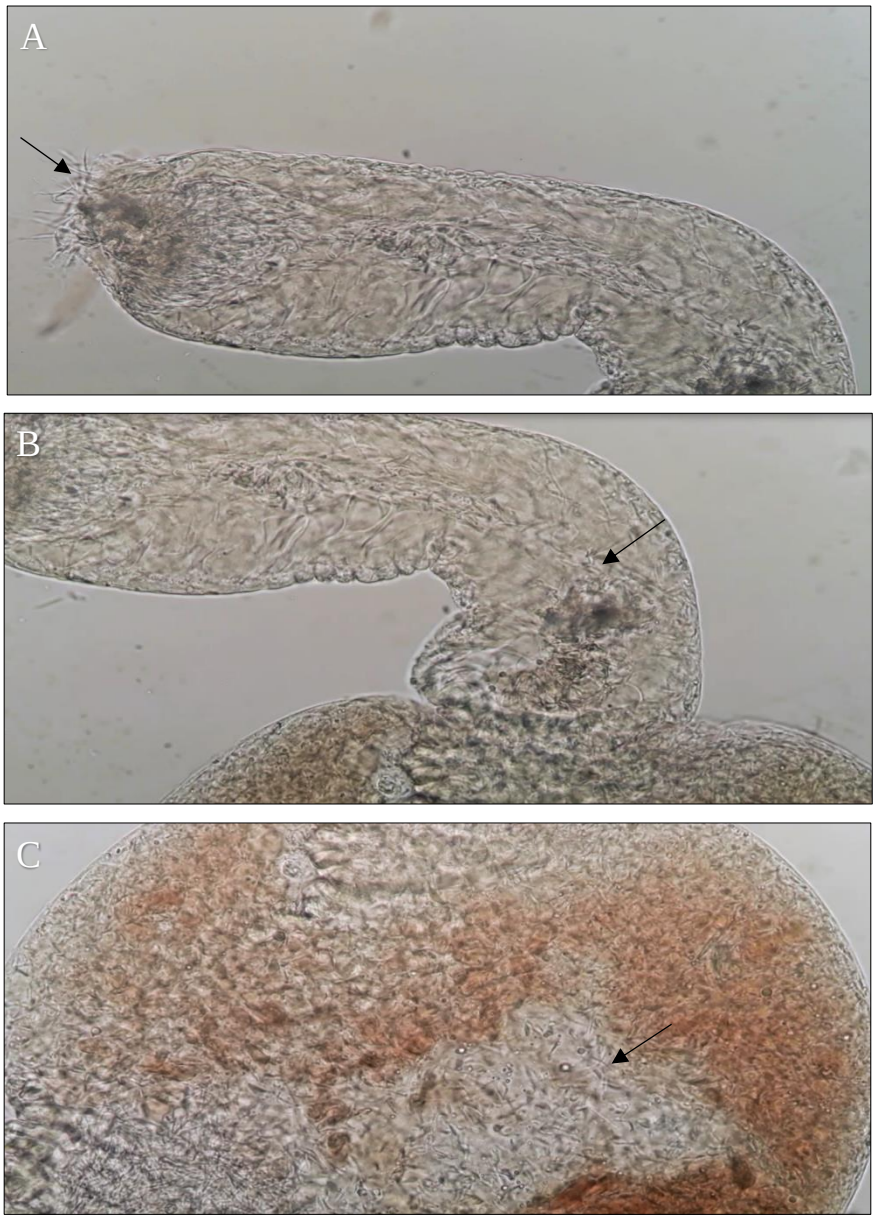


Tabela 3 - Descrição do número de coletas realizadas, período de coleta, localidade, número de fêmeas, positividade no exame parasitológico e espécies encontradas. Coletas realizadas no município de Valinhos-SP

Nº de coletas	Datas	Local	Nº fêmeas de *Lu. longipalpis* coletadas	Nº de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas	Fêmeas com parasitológico positivo	Outras espécies
1	Abr/2018	Parque Valinhos	10	0	0	-
2	Set/2018	(Fazenda Santana dos Cuiabanos- Km 120)	0	0	0	*Expapillata firmatoi, Migonemyia migonei, Nyssomyia whitmani Pintomyia fischeri*
3	Dez/2018	Monte Acrópole (condomínio, km 114)	31	31	2	-
4	Dez/2018	Monte Acrópole (condomínio km 114)	16	16	0	*Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*
		Total	57	47	2	

Dessas duas amostras, uma apresentou 99,59% de identidade com um isolado de *Le. infantum*, depositado no GenBank com o número de acesso MK675913.1 considerando um Query Cover de 100%, entretanto, a outra amostra não apresentou um resultado conclusivo.

Figura 17 - Imagem de Gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 220 pb nas amostras positivas para o gene IVS6 (Cac) de flebotomíneo provenientes de campo. DR: Dracena/VL: Valinhos.

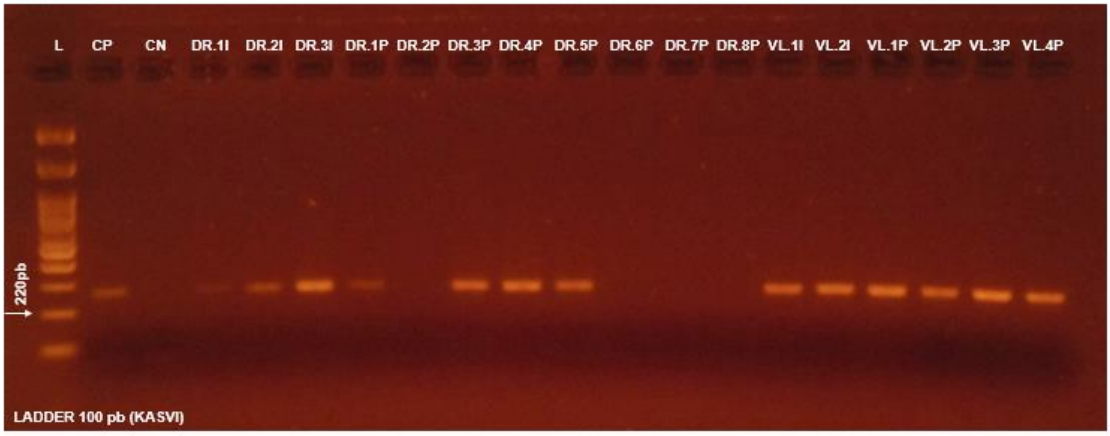


Figura 18 - Imagem de gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 120 pb nas amostras positivas para o gene 13A/13B gene de *Leishmania* ssp. Apresentando positividade para fêmeas provenientes de área de transmissão canina no município de Valinhos. DR=Dracena/VL=Valinhos.

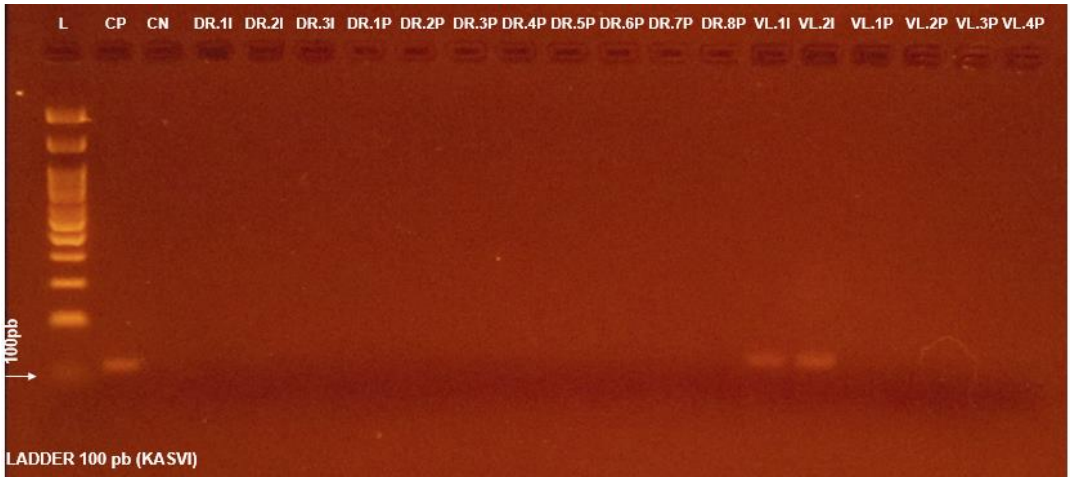
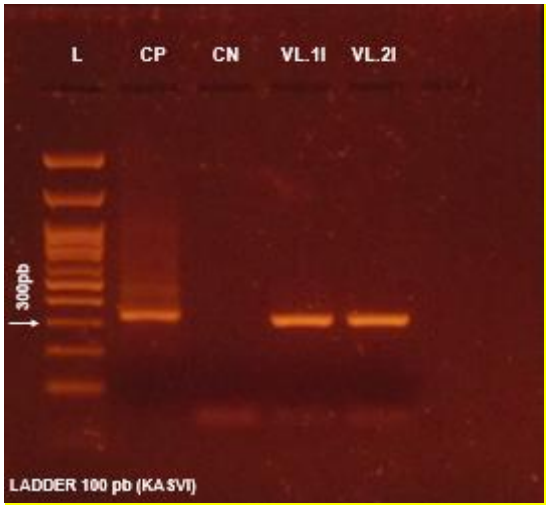


Figura 19 - Imagem de gel de agarose 1,5 % mostrando a banda esperada de 300 pb nas amostras positivas para o gene ITS-1 de Tripanossomatideo.



5.2 INFECÇÃO REALIZADA EM MODELO ARTIFICIAL:

Nos experimentos para avaliar a susceptibilidade à infecção com *Le. infantum*, 61 fêmeas foram ingurgitadas, sendo a maior quantidade da população cembreno-1 (78,7%). A taxa de infecção geral foi 82%. Para a população (S)-9-metilgermacreno-B a taxa de infecção foi 84,6% e 81,3% para a população cembreno-1 (Tabela 4).

Quanto à intensidade de infecção no quinto dia após repasto infectivo, para a população (S)-9-metilgermacreno-B foram observadas somente infecções baixas e moderadas, enquanto que na população cembreno-1 foram observadas infecções em todas as categorias (fraca, moderada, forte e intensa) com predominância de infecção classificada como baixa (Figura 19). Na comparação da intensidade de infecção no quinto e oitavo dia após repasto infectivo, da população cembreno-1, não foram observadas diferenças na intensidade da infecção entre o quinto e oitavo dias (Tabela 5 e Figura 20).

Tabela 4 - Número de fêmeas segundo população e estado de infecção.

População (quimiotipo)	(S)-9-metilgermacreno-B	%	cembreno-1	%	Total	%
Não infectada	2	15,4	9	18,8	11	18,0
Infectada	11	84,6	39	81,3	50	82,0
Total	13	21,3	48	78,7	61	100

Tabela 5 - Número de fêmeas segundo população e intensidade da infecção no quinto dia para ambas as populações e oitavo dia para cembreno-1 após repasto infectivo realizado em sistema de alimentação artificial.

	Dia 5						Dia 8					
População	NI	B	M	F	I	Total	NI	B	M	F	I	Total
(S)-9-metilgermacreno-B	2	7	2	0	0	11	-	-	-	-	-	-
cembreno-1	2	13	2	3	8	28	7	8	1	0	4	20
Total	4	20	4	3	8	39	7	8	1	0	4	20

Legenda: NI: negativa (sem presença de flagelados; B: fraca (+) 1-50 parasitos; M: moderada (++) 51-100 parasitos, F: forte (+++) 101-200 e I: intensa (++++) > 200 parasitos.

Figura 20 - Distribuição de fêmeas das populações (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 de *Lu. longipalpis* alimentadas em sistema artificial segundo intensidade de infecção com flagelados de *Le. infantum*.

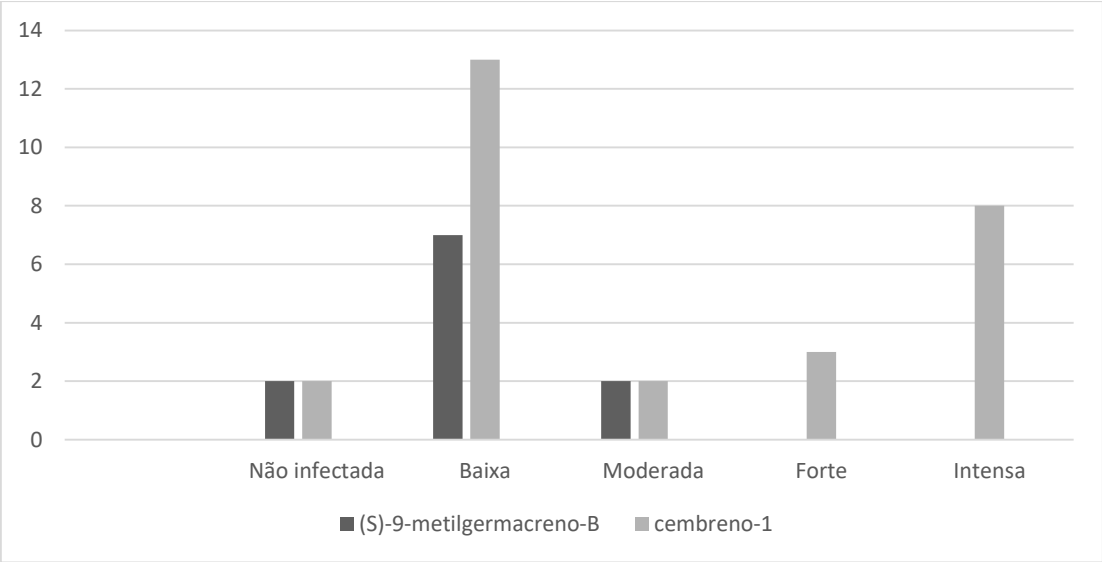
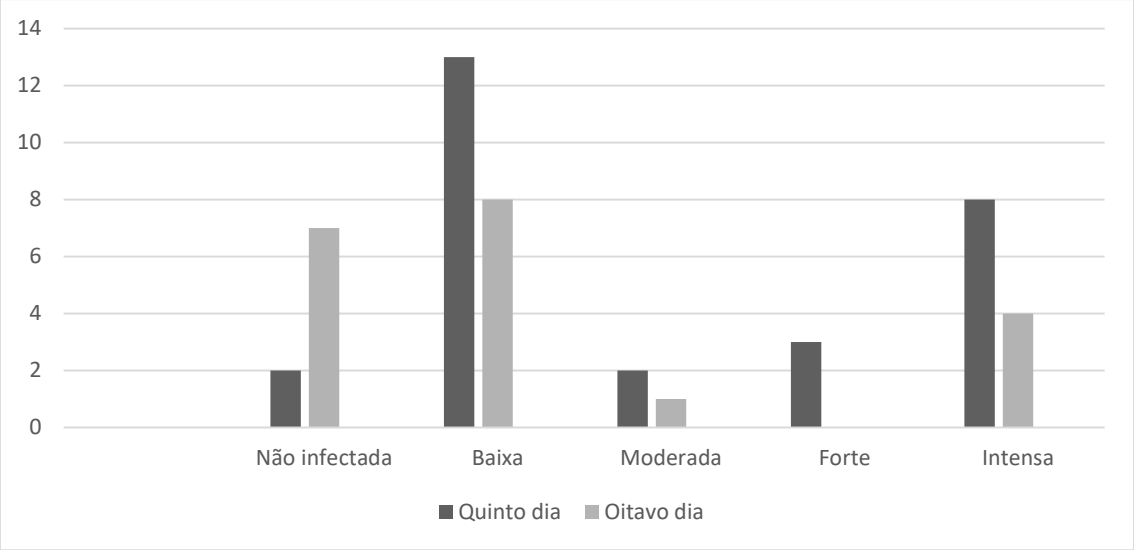


Figura 21 - Distribuição de fêmeas da população cembreno-1 do complexo *Lu. longipalpis*, segundo infecção no quinto e oitavo dia após repasto infectivo.



5.3 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE FÊMEAS DE *Lu. longipalpis* ALIMENTADAS EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Le. infantum*

5.3.1 Xenodiagnóstico

Foram realizados dois experimentos de xenodiagnóstico em cinco gatos, sendo expostas um total de 295 fêmeas, das quais 79,3% foram dissecadas para avaliar a presença de flagelados.

Tabela 6 - Distribuição de fêmeas desafiadas a se alimentarem em gatos infectados com *Le. infantum*, ingurgitadas e dissecadas segundo experimento de xenodiagnóstico.

Xenodiagnóstico	fêmeas expostas N	fêmeas alimentadas N	fêmeas ingurgitadas %	fêmeas dissecadas N	Fêmeas dissecadas %	fêmeas com parasitológico positivo N
Experimento 1	158	158	100	109	69,0	0
Experimento 2	137	137	100	125	91,2	0
Total	295	295	100	234	79,3	0

No primeiro experimento, um total de 158 fêmeas foram expostas e todas se alimentaram, com média de 31,6 fêmeas/gato. Desse total, 109 foram dissecadas para investigação de flagelados e 49 foram descartadas devido ao estado de deterioração. A dissecção foi realizada na medida em que as fêmeas iam morrendo, no intervalo entre um e oito dias. A distribuição das fêmeas dissecadas, segundo dia e estado fisiológico (com sangue, com ovos), o primeiro experimento de xenodiagnóstico, é apresentado na Tabela 7. No exame parasitológico das fêmeas dissecadas não foram detectadas formas flageladas.

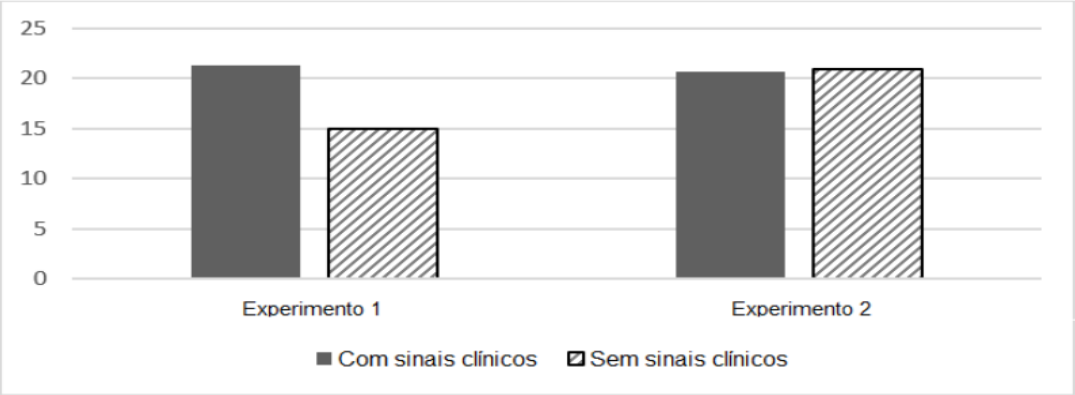
Do total, 109 fêmeas foram dissecadas. A observação da formação dos primeiros ovos ocorreu a partir do terceiro dia após a alimentação sanguínea, a digestão total do sangue se deu no oitavo dia após a alimentação. O tempo máximo de vida das fêmeas pós-alimentação foi de oito dias.

Tabela 7 - Total de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas no primeiro experimento. Gatos com sinais clínicos e sem sinais clínicos. Indicando presença de sangue e presença de ovos.

Dia	Dissecadas	Presença de sangue	Presença de ovos
2	17	17	00
3	13	13	01
4	16	14	12
5	15	12	12
6	24	04	24
7	12	02	12
8	11	00	11
Total	109	62	72

No segundo experimento, um total de 137 fêmeas foram expostas com média de 27,4 fêmeas/gato. Todas as fêmeas expostas se alimentaram, porém, 12 não foram dissecadas, pelo estado de deterioração. No segundo experimento também não foram detectadas formas flageladas no exame parasitológico.

Figura 22 - Distribuição de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas segundo estado de infecção dos felinos (*Felis catus*) e experimento do xenodiagnóstico.



Entre as 125 fêmeas dissecadas na segunda experimento, a formação dos primeiros ovos foi observada a partir terceiro dia após a alimentação sanguínea, no sétimo dia pós- alimentação sanguínea, quatro fêmeas ainda apresentavam sangue no intestino. As fêmeas que estavam vivas no sétimo dia foram eutanasiadas para a realização da dissecção. A distribuição das fêmeas dissecadas segundo dia e estado fisiológico (com sangue, com ovos) na segunda experimento do xenodiagnóstico é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Total de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas na segunda experimento do xenodiagnóstico. Gatos com sinais clínicos e sem sinais clínicos. Indicando presença de sangue e presença de ovos.

Dias	Dissecadas	Presença de sangue	Presença de ovos
2	24	24	00
3	11	11	04
4	06	04	06
5	21	00	21
6	31	02	30
7	32	04	32
Total	125	45	93

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses apresentam um ciclo de transmissão complexo, influenciado por diversos fatores ecológicos relacionados à capacidade vetorial dos flebotomíneos e características da paisagem. No estado de São Paulo, chama a atenção a rápida expansão da LV em áreas urbanas de municípios da região oeste do estado, com notificação de casos caninos e humanos da doença, associada à presença da população (S)-9-metilgermacreno-B de *Lu. longipalpis* (CASANOVA et al., 2015; GALVIS-OVALLOS et al., 2017). Por outro lado, casos caninos também têm sido registrados na região leste do estado (HIRAMOTO et al., 2019), associados a uma paisagem rural e periurbana, onde somente a população cembreno-1 de *Lu. longipalpis* está presente (CASANOVA et al., 2015).

Estas diferenças no padrão epidemiológico podem estar associadas a fatores ecológicos relacionados à capacidade vetorial, tal como a competência vetorial das populações (CASANOVA et al., 2006), assim como fatores relacionados à distribuição de hospedeiros do parasita e a prevalência da infecção. No presente estudo, foi detectada a circulação de fêmeas naturalmente infectadas com *Le. infantum* no município de Valinhos, com uma taxa de infecção de 4,2%, resultado este confirmado através de exames parasitológicos e moleculares, que somados a uma prevalência canina local de 20 % (informação pessoal CASANOVA 2019), aponta para uma situação de alto risco de transmissão, servindo de indicativo para que medidas de controle sejam aplicadas com urgência. Este resultado contribui com as evidências da participação da população cembreno-1 do complexo *Lu. longipalpis* no ciclo de transmissão do agente da LV. As taxas de infecção detectadas na natureza podem variar em diferentes focos dependendo do método de detecção empregado (parasitológico ou molecular), assim como da prevalência da infecção dos hospedeiros. Taxas de infecção variando de zero a 19% têm sido descritas, sendo os valores mais elevados obtidos com técnicas moleculares, dada a alta sensibilidade dessas (MICHALSKY et al., 2010; SOARES et al., 2010 PAIVA et al., 2006; GUSMON da SILVA et al., 2017; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

A dissecção é uma técnica em que a sensibilidade depende da prática e habilidade do observador, além disto, não é possível identificar a espécie de parasita baseado na morfologia (SHAW e LAINSON, 1987). Por esta razão, o seu uso associado a técnicas

moleculares é imprescindível. No entanto, a observação de flagelados de fêmeas silvestres e tipificação da espécie do parasita apresenta um maior significado epidemiológico, pois permite conhecer a intensidade e localização da infecção nos espécimes, assim como a força de infecção na área, sendo essencial para a elaboração e execução de medidas de vigilância entomológica e controle.

Nas duas fêmeas infectadas com flagelados de *Le. infantum* foi observada uma infecção maciça de parasitas, com formas metacíclicas na válvula estomodeal (Figura 16). Levando em conta que foi dissecada uma amostra pequena (47 fêmeas), provenientes de uma única coleta no local, pode se inferir que existe uma elevada força de infecção o que traz à tona a necessidade de medidas para reduzir o risco de transmissão à população humana (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006; MICHALSKY et al., 2002).

Considerando a hipótese de Casanova e colaboradores (2006), de que as populações (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 possam variar na capacidade vetorial, resultando em diferentes perfis epidemiológicos, a susceptibilidade à infecção por *Le. infantum* dessas populações foi avaliada no presente estudo. O método usado para realizar esta avaliação foi realizado pela alimentação em sistema artificial contendo uma concentração conhecida de parasitas, geralmente 10^6 parasitas por mililitro de sangue (MYSKOVA et al., 2008) e posterior dissecção em diferentes tempos para avaliar se em igualdade de condições de repasto infectivo, são observadas diferenças na infecção das fêmeas alimentadas. Quando comparada as duas populações no quinto dia após o repasto infectivo, não foram observadas diferenças significativas na susceptibilidade à infecção. Não foi possível comparar a intensidade da infecção no oitavo dia após o repasto infectivo. Isto pela dificuldade de obter uma quantidade elevada de fêmeas da população (S)-9-metilgermacreno-B alimentadas no sistema artificial. Este é um dos principais desafios no uso deste modelo experimental (LAWYER et al., 2017). Adicionalmente, deve ser considerada a dificuldade em sincronizar a emergência de adultos de diferentes espécies ou populações em condições de laboratório. Porém, nossos resultados sugerem que não existe diferença neste parâmetro entre as duas populações que ocorrem no estado de São Paulo.

Por outro lado, quando comparada a intensidade da infecção na população cembreno-1 após cinco e oito dias após o repasto infectivo, observou-se maior frequência de infecções baixas nos dois períodos de tempo. Este resultado pode estar relacionado com as

condições de temperatura em que as fêmeas foram mantidas (25°C), assim como também ao fato de as fêmeas não terem recebido um segundo repasto sanguíneo o que pode influenciar a intensidade da infecção. Serafim e colaboradores (2018) demonstraram que após um repasto infectivo, quando é oferecido um segundo repasto sanguíneo (não infectivo) as formas promastigotas metacíclicas podem reverter seu estágio promovendo a multiplicação da infecção, aumentando, portanto, a intensidade da infecção.

A não observação de diferenças nas susceptibilidades à infecção por *Le. infantum* no presente estudo, é corroborado pela ocorrência de áreas com transmissão intensa de LV na presença da população cembreno-1, como observado no Estado de Minas Gerais e na Região Nordeste (SPIEGEL et al., 2016). Neste sentindo, as diferenças observadas na ocorrência da LV no estado de São Paulo devem estar associadas a outros fatores independentes da competência vetorial das populações do complexo *Lu. longipalpis.* Entre estes podem ser considerados aspectos da ecologia dessas populações tais como: abundância, distribuição, sazonalidade, hábito alimentares entre outros (CASANOVA et al., 2006; 2015). Também devem ser consideradas diferenças relacionadas à paisagem, à prevalência da infecção canina e à diversidade de fontes alimentares. Recentemente, também tem sido levantada a hipótese da existência de diferenças genotípicas de *Le. infantum* que podem afetar os padrões epidemiológicos observados. Estudos realizadas no estado de São Paulo mostraram diferentes padrões entre as manifestações clínicas da LVC, sendo o genótipo de leishmânia que ocorre no oeste do estado, associada a manifestações mais severas da doença, (MOTOIE et al., 2013),

Na dinâmica de transmissão da LV é conhecido o papel do cão doméstico (*Canis familiaris*) como fonte de infecção para os flebotomíneos e tem sido apontado como fator de risco para a LV em humanos (MAIA e CAMPINO, 2011). Porém, o papel de outras populações de animais, presentes em áreas urbanas é desconhecido. Os gatos constituem uma população frequentemente presente em domicílios e relatos de infecção destes animais com *Le. infantum* tem sido apresentados (MAROLI et al., 2007; SILVA et al., 2010). Porém, o seu papel como fonte de infecção aos flebotomíneos não tem sido esclarecido. Neste estudo foi avaliada a infecção de fêmeas de *Lu. longipalpis* desafiadas a se alimentarem em gatos naturalmente infectados em uma área endêmica de LV do estado de São Paulo. O xenodiagnóstico foi realizado em dois experimentos em cada gato, considerando que os resultados obtidos neste modelo podem variar em função de

diferentes fatores, tais como o estado clínico do animal, entre outros. Observou-se um elevado grau de atratividade dos gatos para os flebotomíneos, com uma taxa de ingurgitamento de 100% das fêmeas. Porém, não foram observadas formas flageladas nas fêmeas examinadas, tanto no primeiro quanto no segundo experimento. Este resultado é contrastante com resultados observados por SILVA e colaboradores (2010), que descreveram uma taxa de infecção de 13,1% de fêmeas alimentadas em um gato. Similarmente, infecção de 21% foi descrita para fêmeas de *Phlebotomos perniciosus* alimentadas em um gato naturalmente infectado (MAROLI et al., 2007). Estas diferenças podem estar relacionadas a métodos distintos de exposição dos animais, uma vez que no nosso estudo as fêmeas se alimentaram em toda a superfície do corpo, enquanto no estudo de Silva e colaboradores (2010), as fêmeas foram todas alimentadas na superfície da orelha. Diferenças também no estado de infecção dos animais devem ser consideradas, pois a carga parasitária na pele do hospedeiro influência na sua capacidade de infectar o vetor. Dos cinco gatos utilizados no estudo, dois não apresentavam sinais clínicos e três apresentavam sinais clínicos, com presença de lesões no corpo, alopecia e linfonodo hipertrofiado, porém, essa diferença não influenciou no resultado.

Pelo fato dos felinos aparentemente apresentarem uma resistência natural à leishmaniose, mesmo sendo susceptíveis à infecção, muitos não apresentam os sinais clássicos da LV, o diagnóstico geralmente vem associado a outras doenças imunossupressoras, tais como FIV e FELV. Isto poderia fazer com os felinos se apresentem como hospedeiros sem sinais clínicos, dificultando o diagnóstico precoce da LV, fazendo com que o animal permaneça por longos períodos como um risco potencial de transmissão da infecção aos vetores (MAIA et al., 2011; PENNISI et al., 2013). Os felinos utilizados nesse estudo eram comprovadamente negativos para FIV e FELV. No entanto, nossos resultados não são conclusivos e estudos envolvendo uma amostra maior de gatos comprovadamente infectados são necessários para elucidar o papel dos gatos como fontes de infecção.

7. CONCLUSÕES

A detecção de fêmeas naturalmente infectadas por *Le. infantum* no município de Valinhos, onde ocorre a população cembreno-1 do complexo *Lu. longipalpis*, foi comprovada com uma taxa de infecção de 4,2% através de exame parasitológico e molecular, evidenciando a sua participação no ciclo de transmissão do agente da LV nessa região;

Os resultados sugerem que não há diferenças entre a susceptibilidade de infecção por *Le. infantum*, em modelo artificial, entre as populações (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1. Não foram observadas diferenças significativas na susceptibilidade à infecção das duas populações de *Lu. longipalpis* (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 no quinto dia após o repasto infectivo;

A susceptibilidade a infecção de ambas as populações do complexo *Lu. longipalpis* (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 por *Le. infantum* não explica as diferenças observadas na ocorrência da LV no estado de São Paulo, assim uma possível diferença na capacidade vetorial das duas populações poderá estar relacionada a diferenças nos parâmetros ecológicos;

Os gatos mostraram elevado grau de atratividade para os flebotomíneos, com uma taxa de ingurgitamento de 100% das fêmeas;

No experimento realizado com fêmeas de *Lu. longipalpis* alimentadas em gatos infectados por *Le. infantum* não foram observadas formas flageladas nas fêmeas examinadas;

A sintomatologia dos gatos infectados (com sinais clínicos e sem sinais clínicos) por *Le. infantum* não influenciou no resultado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos ONE, v.7, n5, p.e35671.2012.

2. Alves-Martin MF, Paixão MS, Silva DT, Tenório MS, Alves ML, Starke WA, Pereira VBR, Lucheis SB. Detection of *Leishmania* spp. using parasitological, serological and molecular assays in asymptomatic and sick cats from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. Asian Pac J Trop Dis. 7(11): 659-664, 2017.

3. Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza NA, Araújo IB, et al. Molecular and behavioral differentation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3:e365.

4. Arrivilaga JC, Feliciangeli MD. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae) complex from La Riconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. J Med Entomol. 2001; 38:783-90.

5. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K et al Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol. 2007.22:148-55. Doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.

6. Brazil RP, Hamilton JGC. Isolation and identification of 9-methylgermacrene-B as the putative sex pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:435–6.

7. Brazil RP, Brazil BG Bionomia In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003; p:257-274.

8. Brazil RP, Caballero NN, Hamilton JGC. Identification of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Asunción, Paraguay. Parasit Vectors. 2009;2:51.

9. Brazil RP, de Andrade W, dos Santos A, Parente J, Hamilton JGC. Presença de dois morfotipos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) ocorrendo em simpatria em Porto Nacional, estado do Tocantins. XXI Congr. Bras. Entomol. 2010. P. ID: 130-1.

10. Bruford MW. Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1998). Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. In: Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach, 2nd. edition, (ed. Hollzel AR), pp. 287-336. JRL Press, Oxford, UK.

11. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR; Guiraldo MM; Oliveira AM, et al. Introduction and expansion of human American Visceral Leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil,1999-2011. Rev. Saúde Pública. 2013, 47(4):1-9.

12. Casanova C, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa AIP. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil.Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.101 (1): 113-115, 2006.

13. Casanova C, Jacques FEC, Hamilton JGC, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo State, Brazil. PloS Negl Trop Dis, 2015;9(3): e0003620.

14. Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1997, 31(6):632-633.

15. CVE- Centro de Vigilância Epidemiológica- Professor Alexandre Vranjac- 2016 Dados de casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, estado de São Paulo, 2014-2016.

16. D'Andrea LAZ, Camargo-Neves VLF, Sampaio SMP, Kronka SN, Sartor IF. American visceral leishmaniasis: disease control strategies in Dracena microregion in alta paulista SP, Brazil. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2009;15(2):305–324. doi: 10.1590/S1678-91992009000200012.

17. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther 2009; 22: 491-502.

18. Desbois N, Pratlong F, Quist D, Dedet JP. *Leishmania* (*Leishmania*) *martiniquensi*s n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies. Parasite. 2014; 21: 12.

19. Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites & Vectors 2012, 5:276.

20. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 94, p.575-579. 2000.

21. Espinosa AO, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An Appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanossomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology 2016:1-13.

22. Forattini O, Rabello EX, Pattoli DGB. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ e NEIVA, 1912) no estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde públ., 4 (1):99-100, 1970.

23. Forattini O P. Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 658 p.1973.

24. Galati EAB. Apostila de bioecologia e identificação de phlebotominae (Díptera, Psychodidae) - Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.São Paulo.Brasil.2017. <www.fsp.usp.br/~egalati>

25. Galvis-Ovallos F. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Cunha & Chagas. 2011. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo.

26. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá AP. Galati EAB. Ecological paremeters of the (S) 9 methylgermacrene – B population of *Lutzomyia longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. Parasites e Vectors (2017) 10:269.

27. Gontijo B. Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana, Revista da Sociedade Brasileira de Med. Tropical 36(1): 71-80/jan-fev,2003.

28. Goto H, Lindoso JAL. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 2012; 26; 293- 307.

29. Grevot A, Jaussaud H, Marty P, et al. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. Parasite J 2005; 12: 271–275.

30. Gusmon da Silva V, Taniguchi HH, Richini-Pereira VB, Nobrega DB, Elias CR, Tolezano JE. Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e infecção natural por *Leishmania infantum* em municípios da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Revista - Instituto Adolfo Lutz, v. 76, p. 1, 2017.

31. Hamilton JG, Ward RD. Gas- Chromaographic analysis of *Lutzomyia longipalpis* tergal pheromone gland extract. Parassitologia. 1991; 33(Suppl): 283-9.

32. Hamilton JG, Dougherty MJ, Ward RD. Sex Pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) from Jacobina. J Chem Ecol. 1994; 20:141-51.

33. Hamilton JG, Dawnson GW, Picket JA. 9- methylgermacrene-B; Proposed structure for novel homoesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. J Chem Ecol. 1996; 22:1477-91

34. Hamilton JG, Ward RD, Dougherthy MJ, Maingon R, Ponce C, Ponce E, *et al* Comparasion of the sex pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneos leishmaniasis in Honduras and Cost Rica. Ann Trop Med Parasitol. 1996; 90:533-41.

35. Hamilton JGC, Hooper AM, Pickett JA, Mori K, Sano S. 3- Methyl-α-himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. Chem Commun. 1999; 4:355-6.

36. Hamilton JGC, Brazil RP, Maingon R. A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. J Med Entomol. 2004; 41:1021-6.

37. Hamilton JGC, Maingon RDC, Alexander B, Ward RD, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Med Vet Entomol. 2005;19:480-8.

38. Hervás J, De Lara F, Sánchez-Isarria M, et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. J Feline Med Surg 1999; 1: 101:105.

39. Hiramoto RM et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2017. BEPA;16(182):11-35.2019

40. Holcman MM, Sampaio SMP, Rangel O, Casanova. Spatial and sazonal distribution of *Lutzomyia longipalpis* in Dracena, a city in the western region of the state of São Paulo, Brazil, that is endemic with visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop.2013;46(6);704-12

41. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=353540>. Acesso em: 14/12/2017.

42. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=355620> Acesso em: 14/12/2017.

43. Jacques FEC, Casanova C, Prado AP. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol 105(2); 208-215, March 2010.

44. Kamhawi S. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? TRENDS in Parasitology 22 nº9. 2006.

45. Killick – Kendric M., Killick – Kendric, R. The initial establishment of sandfly colonies. Parassitologia. 1991; 33 (Supl. 1): 315-20.

46. Killick – Kendric R. Phlebotominae vectors of the leishmaniases: A Review. Medical and Veterinary Entomology (1990) 4, 1-24.

47. Lainson R. Rangel EF. Ecologia das Leishmanioses In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003; p 311-336.

48. Lainson R. Shaw JJ. New World Leishmaniasis. *In*: FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds.) Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. London, Sydney, Auckland, Topley e Wilson's Arnold. 2005.

49. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniases in biology and medicine. London: Academic Press. 1–120.1987.

50. Lane RP,Ward RD. The morphology and possible function of abdominal patches in males of 2 forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). Cah ORSTOM (Oficce la Rech Sci Tech Outre-Mer) Ser Entomol Medicale Parasitol. 1984;22:245-9. 32.

51. Lawyer P, Killick- Kendrick M, Rowland T, Rowton E, Volf P. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). Parasite 24, 42 (2017).

52. Leiva M, Lloret A, Peña T, et al. Therapy of ocular leishmaniosis in a cat. Vet Ophthalmol 2005; 1: 71–75.

53. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RL , et al.. Detection of different *Leishmania spp* and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2012;35(5):469-76

54. Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of Zoonotic leishmaniasis? Trends in Parasitology, v. 27. p. 341-44, 2011.

55. Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia dos flebótomos do Ceará. Rev Bras Mal Doen Trop 21:3-26. 1969.

56. Marcondes CB. Entomologia médica e veterinária. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2011.

57. Marcos R, Santos M, Malhão F, et al. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniosis. Vet Clin Pathol 2009; 38: 201–205

58. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum. Veterinary Parasitology,* Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

59. Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Marquez F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* Volume 100, Issue 6, June 2006, Pages 527–532, https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.08.005

60. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmanisis: clinical syndromes and treatment. Q J Med 2014; 107:7–14.

61. Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. Bras Med. 1940;54(12):180.

62. Mendonça IL, Batista FJ, Ribeiro JMM, Rocha FSB, SILVA SO, MELO MN. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. Parasitology Open (2017), Vol. 3, e1; page 1 of 8.

63. Myskova JL, Votypka J, Volf P. Leishmania in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. J Med Entomol. 2008 Jan;45(1):133-8.

64. Ministério da Saúde- Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf Acesso em: 17/01/2018.

65. Ministério da Saúde - http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados. Acesso em: 18/02/2018.

66. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev. Inst. Med. Trop. 2002; 44(5): 255-259.

67. Michalsky EM, Guedes KS, Silva FL, França-Silva JC, Dias Cl, Barata RA, Dias ES. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Díptera: Psychodidae) sand flies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop.2010;44(1):58-62.

68. Motoie G, Ferreira GEM, Cupolillo E, Canavez F, Pereira- Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. Infection, Genetics and Evolution.v. 18, p. 48-59, 2013.

69. Oliveira TMFS; Silva DT; Alves ML;Spada JCP; Benassi JC; Leonel JAF; Pereira NWB; Starke-Buzetti WA. An analysisof hematological and biochemical parameters of cats infected by Leishmania infantum.1 st Internaticional Caparica Congress on Leishmaniasis. Portugal, 29-31 october.2018.

70. Ozon C, Marty P, Pratlong F. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. Vet Parasitol 1998; 75: 273–277.

71. PAHO- Panamerican Health Organization-Leishmaniases. Epidemiological Report in the Americas. Leishmaniases Report.#4. July 2016.

72. Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Júnior HF, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad. Saúde Pública. 2007; 23(1): 87-94.

73. Peel MC, Finlayson BL, Mcmahon TA. Update world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrology and earth system sciences discussions, European Geosciences Union, 2017, 11 (5), pp. 1633-1644.

74. Pennisi MG. A high prevalence of feline leishmaniosis in southern Italy. Intervet Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniosis Forum; 2002 Feb 6–9; Seville, Spain. Boxmeer: Intervet, 2002, pp 39–48.

75. Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg. Jul;15(7):638-42.2013.

76. Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. In: Interação vetor hospedeiro-Interação *Leishmania* - hospedeiro invertebrado. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003;p:275-289.

77. Pimenta PFP, Freitas VC, Secundino NFC. Capítulo 12. A interação do protozoário leishmania com seus insetos vetores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Molecular. INCT EM. 2012.

78. Pires, ACAM. Dissertação de mestrado: Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia (L.) longipalpis* com diferentes espécies de *Leishmania*. – Belo Horizonte, 2014.

79. Pocholle E, Reyes-Gomez E, Giacomo A, et al. Un cas de leishmaniose féline disséminée dans le sud de la France. Parasite 2012; 19: 77–80.

80. Poli A, Abramo F, Barsotti P, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Vet Parasitol 2002; 106: 181–191.

81. Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Chiaravolo RMC, et al (2013) Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle de leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. BEPA 10(111):5-16.2013

82. Santos MFC, Ribolla PEM, Alonso DP, Andrade- Filho JD, Casaril AE, Ferreira AMT, et al. Genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* poupulations in Mato Grosso do Sul, Brazil, based on microsatellite markers. PLoS One. 2013; 8:e74268.

83. Savani ESMM, Camargo MCG, Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'áuria SRN, Shaw JJ, Winter LMF. The first record in the Americas of an autochtonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State Brazil. Vet. Parasitol. 25, 229-233, 2004.

84. Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote Leishmania experimentotion and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. Nat Microbiol. 2018 May;3(5):548-555. doi: 10.1038/s41564-018-0125-7.

85. Sereno D. et al. Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, n. 12, p. 3097–3102, 1998.

86. Sergent E, Lombaard J, Quilichini M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d´um enfant, d´um chien et d´um chat dans la meme habitation. Bull Soc Pathol Exotique. 1912;5:93-8.

87. JJ, Pratlong F, Floeter-Winder L, Ishikawa E, Baidouri FE, Ravel C, Dedet JP. Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) *waltoni* n. sp. (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. Am. J. Trop. Med. Hyg., 93(3), 2015, pp. 552-558.

88. Sherlock IA, Sherlock VA. On the experimental infection of *Phlebotomus longipalpis* by *Leishmania donovani*. Rev Bras Biol 22:409-418.1961.

89. Simões-Mattos L, Teixeira MJ, Costa DC, Prata Jr JRC, Bevillaqua CML, Sidrim JJC, et al. Evalution of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi* -infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). Vet Parasitol. 2002;103(3):207-16.

90. Silva SM, Rabelo PF, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, MMS.First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

91. Soares MR, Carvalho CC, Silva LA, Lima MS, Barral AM, Rebêlo JM, Pereira SR. Molecular analysis of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2010;26(12):2409–13.

92. Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ. Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). Arthropod Struct Dev. 2002; 30:219-27.

93. Spiegel CN, Dias DBS, Araki A, Hamilton JGC, Brazil RP, Jones TM. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation- sex pheromone communication. Parasites e Vectors 9:580 DOI 10.1186/s13071-016-1866-x. 2016.

94. SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias. http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/situacao-atual. Acesso em: 14/12/2017.

95. SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias. http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/doenca. Acesso em: 14/12/2017.

96. Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Barbosa JER, Pinto PLS, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região Oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32 (Supl): 218, 1999.

97. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 64 p. 19- 24, 2001.

98. Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha e Chagas, and its significance to kala-azar distribution in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983; 78(3): 269-80.

99. Ward RD, Phillips A, Burnet B, Marcondes CB. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: Service MW, ed. Biosystematics of haematophagous insects. Oxford: Systematics Association Special, Clarendon Press; 1988. p. 257-69.

100. Watts PC, Hamilton JGC, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of *Lutzomyia longipalpis*

species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73:734-43.

101. WHO- World Health Organization. 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: http://apps.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf. Acesso em: 23/12/2017.

ANEXO A

MEDICINA
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do potencial vetor de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) para transmitir leishmania infantum chagasi**", registrada com o **nº 1026/2018**, sob a responsabilidade de **Márcia Dalastra Laurenti**, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 22.08.18

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	Início: 02-05-2018 Término: 01-05-2020	
Espécie/linhagem/raça	Hamster	Cães
Nº de animais	**150**	**60** (30 machos e 30 fêmeas)
Peso/Idade	6 semanas	indiferente
Sexo	macho	Macho e fêmea
Origem	Biotério FMUSP	Centro de Controle de Zoonoses

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 22 de Agosto de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (Felis catus) NATURALMENTE INFECTADOS POR Leishmania spp.", protocolada sob o CEUA nº 5179201118 (ID 001255), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira** *e equipe; Geovanna Vioti* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 21/08/2019.

We certify that the proposal " Xenodiagnosis on domestic cats (Felis catus) naturally infected by Leishmania spp.", utilizing 104 Cats (males and females), protocol number CEUA 5179201118 (ID 001255), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira** *and team; Geovanna Vioti* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 08/21/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 08/2020 Área: Medicina Veterinária

Origem:	Animais provenientes de outros projetos						
Espécie:	Gatos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 30 anos	N:	104
Linhagem:	SRD			Peso:	1 a 30 kg		

Local do experimento: LMVPA- FZEA/USP Laboratório de Imunoparasitologia-Departamento de Zootecnia e Biologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira FEIS/UNESPP

Pirassununga, 22 de setembro de 2019

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Av. Duque de Caxias Norte, 225 - CEP 13635-900 Pirassununga/SP - tel: 55 (19) 3565 6759
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 13h30 as 17h ; e-mail: ccpfzea@usp.br
CEUA N 5179201118

CURRÍCULO LATTES

Mariana Dantas da Silva

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6435012258593092

Última atualização do currículo em 12/02/2019

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Braz Cubas (2012). Participou do Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo junto à Faculdade de Saúde Pública da USP, na área de Entomologia Médica e Soroepidemiologia (2017). Atualmente aluna de mestrado em Saúde Pública , pela Faculdade de Saúde Pública da USP. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Mariana Dantas da Silva

Nome em citações bibliográficas SILVA, M. D.;DA SILVA, MARIANA DANTAS

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em andamento em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Publica da USP, FSP/USP, Brasil.
Título: Aspectos do potencial de transmissão de Leishmania infantum por dois quimiotipos do complexo Lutzomyia longipalpis,Orientador: Eunice Aparecida Bianchi Galati.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2006 - 2012 Graduação em Ciências biológicas.
Universidade Braz Cubas, UBC, Brasil.
Título: Observação do desenvolvimento, construção da tábua de vida e comparação de três gerações de Lutzomyia longipalpis (Diptera:psichodidae) em condições de laboratório..
Orientador: Vanda Trettel.

Formação Complementar

2018 - 2019 Entomologia Aplicada a Saúde Pública. (Carga horária: 40h).
Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde, CONASEMS, Brasil.

2016 - 2017 Extensão universitária em Aprimoramento Profissional. (Carga horária: 2000h).
Faculdade de Saúde Publica, FSP, Brasil.

2016 - 2016 II Curso de Parasitologia Voltado à Saúde Pública. (Carga horária: 50h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

2012 - 2012 Auxiliar Veterinário. (Carga horária: 100h).
Centro de Ensino e Treinamento em Anatomia e Cirurgia Veterinária, CETAC, Brasil.

2009 - 2009 Extensão universitária em Extensão Universitária em Plantas Medicinais. (Carga horária: 50h).
Universidade Braz Cubas, UBC, Brasil.

Eunice Aparecida Bianchi Galati

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/1359035734723864

Última atualização do currículo em 22/02/2019

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1977), graduação em Ciências pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1981) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1990). Atualmente é professor associado no Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Coordena o Curso de Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública. É membro da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Saúde Pública e da Comissão de Coordenação do Curso de Bacharelado em Saúde Pública. Tem experiência no ensino de graduação e pós-graduação em Epidemiologia e em Zoologia, com ênfase em Entomologia em Saúde Pública, atuando principalmente nos seguintes temas: Phlebotominae, Psychodidae, leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral taxonomia e vetores É lider do grupo de Pesquisa: taxonomia e ecologia de vetores de leishmanioses. Atualmente desenvolve projetos sobre avaliação de parâmetros que medem a capacidade vetorial de algumas espécies de flebotomíneos em relação à Leishmania braziliensis e Leishmania infantum. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Eunice Aparecida Bianchi Galati

Nome em citações bibliográficas GALATI, E. A. B.;Galati, E.A.B.;Galati, Eunice A. B.;GALATI, EUNICE A.B.;BIANCHI GALATI, EUNICE APARECIDA;EUNICE APARECIDA GALATI;GALATI, EUNICE AB;GALATI, EUNICE APARECIDA;GALATI, EUNICE APARECIDA BIANCHI;GALATI, E.A.B;GALATI, E A B;GALATI, EUNICE A B

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia.
Av. Dr. Arnaldo, 715
Cerqueira Cesar
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617786
Fax: (11) 30617926

Formação acadêmica/titulação

1983 - 1990 Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas, Ano de obtenção: 1990.
Orientador: Ubirajara Ribeiro Martins de Souza.
Palavras-chave: Sistemática; Psychodidae; Taxonomia; Phlebotominae; Diptera.
Grande área: Ciências Biológicas
Setores de atividade: Saúde Humana.

1979 - 1981 Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aspectos taxonômicos e biogeográficos do gênero Psychodopygus Mangabeira, 1941 e sua importância epidemiológica (Diptera, Phlebotominae),Ano de Obtenção: 1981.
Orientador: Oswaldo Paulo Forattini.
Palavras-chave: Taxonomia; Biogeografia; Diptera; Phlebotominae; Psychodopygus.
Grande área: Ciências Biológicas
Setores de atividade: Saúde Humana.

1978 - 1978 Especialização em Curso de Especialização Em Saúde Pública. (Carga Horária: 978h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

1972 - 1977 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

1972 - 1976 Graduação em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.