



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado



ESTUDO DA CAPACIDADE E COMPETÊNCIA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) COMO VETOR DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ROSA CRISTINA RIBEIRO DA SILVA

São Luís
2021

ROSA CRISTINA RIBEIRO DA SILVA

ESTUDO DA CAPACIDADE E COMPETÊNCIA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) COMO VETOR DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de *Doutora em Ciências da Saúde*.

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo

Coorientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

São Luís
2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro da Silva, Rosa Cristina.

ESTUDO DA CAPACIDADE E COMPETÊNCIA DE *Lutzomyia longipalpis* DIPTERA: PSYCHODIDAE COMO VETOR DE *Leishmania Leishmania amazonensis* / Rosa Cristina Ribeiro da Silva. - 2021.

111 f.

Coorientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Orientador(a): José Manuel Macário Rebêlo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Colônia de flebotomíneos. 2. Interação vetor-parasito. 3. Leishmaniose tegumentar. 4. Transmissão experimental. 5. Vector permissivo. I. Ferreira Pereira, Silma Regina. II. Macário Rebêlo, José Manuel. III. Título.

ESTUDO DA CAPACIDADE E COMPETÊNCIA DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) COMO VETOR DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ROSA CRISTINA RIBEIRO DA SILVA

Tese de defesa de Doutorado apresentada em 13 de abril de 2021 constituída da seguinte banca examinadora:

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho
Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, MG

Prof. Dr. Adalberto Alves Pereira Filho
Universidade Federal de Minas Gerais

“O erro nem sempre determina o fracasso, mas a insistência pode levar ao sucesso”

Autor anônimo

Dedico esta tese à minha mãe **“Iraní Ribeiro da Silva”** e aos meus avós **“Rosa Cardoso Ribeiro da Silva e Raimundo Dias da Silva”**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar e sempre proporcionar coisas boas na minha vida;

À toda minha família, em especial a minha mãe, Iraní Ribeiro da Silva, pelo amor, educação, compreensão pela ausência, paciência, apoio e constante incentivo para concretização dos meus sonhos;

Ao meu Orientador, professor Dr. José Manuel Macário Rebêlo, pela excelente orientação, dedicação, paciência e por estar sempre disposto a ajudar, pela oportunidade, por ter acreditado em meu trabalho e investido em mim, também pela confiança e compreensão na realização do trabalho e por todo conhecimento discutido e aprendido e principalmente por me proporcionar trabalhar com flebotomíneos. Não tenho palavras para descrever meu amadurecimento pessoal e profissional que adquiri durante este doutorado. “Meu pai científico”, meu muito obrigada!

À minha coorientadora Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira, que também está sempre disposta a ajudar, pois mesmo distante, em uma de suas viagens, sempre fazendo correções deste trabalho. Pela excelente orientação, dedicação, paciência, confiança, discussões de metodologias e principalmente pelo carinho e amizade. Por acreditar no meu potencial e investir em mim na carreira internacional, que infelizmente, por conta da pandemia, não deu certo. É uma honra fazer parte da sua equipe, sou muito grata, meu muito obrigada!

A minha “família” de São Luís, Catarine Freitas Mota, Elizane Silva Nogueira, Pablo Rafael Araújo Lima e Pedro José de Oliveira Neto. Meu muito obrigada por todo o apoio, amizade e amor que me deram;

A todos os amigos companheiros do Laboratório de Entomologia e Vetores (em especial Jesiel, Mariza, Samara, Apoliana, Benedita, Bruno Leite, Eric Barros, Ana Vanniezy, Jorge Luís, Gildário) e do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (em especial Gustavo Henrique (Gugú), Hugo Gama, Raissa Lacerda, Patrícia Valéria, Profa. Vera, André e Ana Jéssica) pelo acolhimento, carinho, companheirismo e ajuda constante de todos os dias;

A amigo, que levarei para vida, Léo Nava Piorsky Dominici Cruz (Leozinho), por tudo que vivenciamos juntos. Meu muito obrigada por ser meu amigo, meu suporte técnico, por sempre estar presente e disposto a me ajudar;

Agradecimento especial ao João Manoel da Silva Coutinho pelo acolhimento, companheirismo, amizade e ajuda constante em todas as coletas;

Agradecimento especial ao Adalberto Alves Pereira Filho, amigo que ganhei durante o doutorado. Foi a pessoa que conseguiu as cepas de leishmânia, trouxe para São Luís e me ensinou a manter-las em cultura, infectar os animais e congelar as cepas para trabalhos futuros. Além disso, pelas nossas discussões sobre o trabalho, incentivo, apoio, carinho e principalmente a amizade. Meu muito obrigada!

A Profa. Mayara Ingrid do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, que sempre me ajudou. Foi fundamental na aprovação do projeto no comitê de ética animal, nos trabalhos moleculares, por me ajudar exaustivamente para que eu fosse fazer o doutorado sanduíche, pelo apoio, incentivo e amizade. Obrigada pelo carinho Profa.;

A Elizângela Araújo Pestana Motta pela ajuda, por ensinar a técnica de imunossupressão dos camundongos e também por me conceder a droga, meu muito obrigada;

Ao Prof. Carlos Eduardo (Cadú), que me ajudou nas análises histopatológica e imunohistoquímica, meu muito obrigada;

Aos todos meus amigos de turma por todas as experiências vividas e adquiridas durante o curso, em especial a Elis Victor e Luciana da Silva Bastos, pela amizade, companheirismo e incentivo durante a pesquisa;

Aos professores do PPGCS, que durante as disciplinas, demonstravam interesse a ajudar discutindo metodologias, estatística e etc. Meu muito obrigada!

À Dona Maria, residente do município de Raposa, que contribui com esse estudo, uma vez que me autorizou a realizar coletas de flebotômicos em sua residência toda semana;

Aos professores membros da banca avaliadora desta tese por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições (Dr. Adalberto Alves Pereira Filho; Dra. Ana Lúcia Abreu Silva; Dr. José Dilermando Andrade Filho; Dr. Lívio Martins Costa Junior);

À CAPES e FAPEMA, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa que possibilitou minha permanência em São Luís e pelo apoio financiamento que possibilitou a realização desta pesquisa;

A realização deste trabalho só foi conseguida com sucesso com a ajuda de várias pessoas que, de algum modo, contribuíram para que esse dia da defesa chegasse. Por isso agradeço imensamente a todas as pessoas que sempre me incentivaram, que dedicaram algum momento da sua vida para permitir a realização deste trabalho, auxiliando de maneira pessoal ou profissional, e que por um simples descuido não foram mencionadas aqui. Meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço à Jesus Cristo, meu maior ídolo, consolador de todas as dores, que me ilumina em todos os momentos de minha existência.

RESUMO

Estudos de capacidade e competência vetorial requerem a disponibilidade de colônias de insetos vetores de doenças em condições laboratoriais. O táxon *Lutzomyia longipalpis* é incriminado como vetor natural de *Leishmania (Leishmania) infantum*, porém tem se demonstrado permissivo para várias espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar americana (LTA). Por esta razão, o trabalho teve como objetivo demonstrar a competência de *Lu. longipalpis* em transmitir *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongo causando manifestação clínica de LTA no animal. Inicialmente, foi estabelecida uma colônia de *Lu. longipalpis* a partir de fêmeas capturadas no município da Raposa, MA, utilizando-se armadilha luminosa do tipo CDC. A colônia produziu dez gerações (F10) a partir da geração parental (P). A maior produtividade da colônia foi nas quatro primeiras gerações. O ciclo de vida completo durou, em média, $28 \pm 0,5$ dias, a 27°C e umidade relativa de 80%. Os ovos inviáveis representaram mais de 50% do total de ovos produzidos pelas fêmeas ingurgitadas, enquanto as pupas apresentaram índice de mortalidade de apenas 2%. Nos ensaios de capacidade e competência vetorial, 291 fêmeas de *Lu. longipalpis* de geração F1, F2 e F3 (livre de infecção de *Leishmania*) realizaram um primeiro repasto sanguíneo em camundongos infectados com *Le. amazonensis* (linhagem IFLA/BR/1968/PH8). Após a alimentação, 52,6% positivaram DNA de *Leishmania*. Destes, 17 (dos quais 58,8% foram positivos para *Leishmania* por dissecação do intestino) efetuaram um segundo repasto sanguíneo em camundongos não infectados. Após 27 dias de infecção, um dos camundongos apresentou um edema no membro anterior direito característico de lesão leishmaniótica. O teste de diluição limitante e as análises imunohistopatológicas confirmaram a ocorrência de formas promastigotas e amastigostas de *Leishmania*, respectivamente, na lesão do membro anterior do animal. Também foi detectado DNA do parasita em lesões do membro anterior esquerdo e linfonodo poplíteo. O sequenciamento do DNA confirmou a espécie *Leishmania* tanto em insetos como no camundongo. Os resultados confirmam a capacidade de *Lu. longipalpis* sustentar a infecção e transmitir experimentalmente *Le. amazonensis* a roedores, induzindo lesões leishmanióticas. Do ponto de vista epidemiológico da LTA urbana, onde tanto *Lu. longipalpis* como *Le. amazonensis* coabitam extensivamente pelo Novo Mundo, inclusive em várias regiões do Brasil, a suscetibilidade do teste de transmissão confirma a possibilidade do papel vetorial deste flebotomíneo para transmitir *Le. amazonensis* na região estudada.

Palavras-chave: Vector permissivo; Transmissão experimental; Colônia de flebotomíneos; Leishmaniose tegumentar; Interação vetor-parasito.

ABSTRACT

Studies about vectorial capacity and competence for the transmission of certain parasites require laboratory colonization of their biological vectors. The sand fly *Lutzomyia longipalpis* is incriminated as the main vector of *Leishmania (Leishmania) infantum*, but it has been shown to be permissive for several *Leishmania* species that cause american cutaneous leishmaniasis (ACL). Therefore, we demonstrate the competence of *Lu. longipalpis* in transmitting *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice, causing clinical manifestation of ACL in these animals. Initially, we established a colony of *Lu. longipalpis* from females sampled in the municipality of Raposa, MA, using CDC light traps. The colony produced ten generations (F10) from the parental generation (P). The first four generations showed the highest productivity. The whole life cycle lasted on average $28 + 0.5$ days at 27°C and 80% relative humidity. Nonviable eggs represented more than 50% of the total number of eggs produced by the engorged females, while pupae had a mortality rate of only 2%. In the tests for vectorial capacity and competence 291 uninfected females of *Lu. longipalpis* of generation F1, F2 and F3 performed a first blood feeding on mice infected with *Le. amazonensis* (strain IFLA / BR / 1968 / PH8). After blood-feeding, 52.6% of the females were positive for *Leishmania* DNA. Of these, 17 (of which 58,8% were positive for *Leishmania* by dissection of the intestine) performed a second feeding on uninfected mice. At 27 days post-infection, one mouse presented leishmaniotic lesions. The limiting dilution test and immunohistopathological analyses confirmed the occurrence of *Leishmania* promastigote and amastigote forms, respectively, in the skin of the animal. Parasite DNA was also detected in lesions on paws and inguinal lymph node. DNA sequencing and analysis confirmed the *Leishmania* species infecting both insects and mice. Our results confirm that *Lu. longipalpis* can sustain infection and experimentally transmit *Le. amazonensis* to rodents, inducing leishmaniastic lesions. From the epidemiological perspective of the urban ACL, the successful transmission demonstrated supports the role of *Lu. longipalpis* as a vector of *Le. amazonensis* in the studied region and possibly in others throughout Brazil and the New World, where both sand fly and parasite are widespread.

Key-words: Permissive vector; Experimental transmission; Sand fly colony; Tegumentary leishmaniasis; Vector-parasite interaction.

LISTA DE FIGURAS

Tese. Estudo da capacidade e competência de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) como vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Figura 1. Representação do ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis* com as seguintes fases: ovos (A), larvas (B), pupa (C) e adultos, macho e fêmea. Fonte: Fotos retiradas da colônia de *Lu. longipalpis* do insetário do LEV, UFMA, Brasil.25

Figura 2. Flebotomíneos adultos (*Lutzomyia longipalpis*). A esquerda, macho com extremidades posterior bem desenvolvidos em formato de uma garra nos últimos seguimentos abdominais e a direita fêmea com últimos seguimentos mais discretos conferindo um aspecto arredondado. Fonte: Autora.26

Figura 3. Ciclo de vida de protozoário parasito do gênero *Leishmania* das Américas. Fonte: WHO, 2019, adaptado da Universidade Federal de Goiás.30

Figura 4. Reservatórios domésticos (A) e silvestres (B a D) de protozoário parasito do gênero *Leishmania* Fonte: OPS, 2019.31

Figura 5. Classificação básica das espécies de *Leishmania*, determinada pelo seu padrão de desenvolvimento no tubo digestório de flebotomíneos. Adaptado de Lainson e Shaw (1979). LEGENDA: ph = faringe; oe = esôfago; c = cárdia; tm = intestino médio torácico; cr = papo (crop); mt = túbulos de Malpighi; am = intestino médio abdominal; py = piloro; i = íleo; ra = ampola retal; r = reto.32

Figura 6. Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor. Fonte: Sacks e Kamhawi, 2001.35

Figura 7. Desenho esquemático simplificado da capacidade (A) e competência (B) vetorial de um flebotomíneo se infectar e transmitir *Leishmania* spp. para animais veterbrados. Fonte: adaptado por Ribeiro-da-Silva, R. C. 2021.38

Figura 8. Localização do município de Raposa destacado de vermelho, na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Fonte: Batista, C. (2019).45

Figura 9. (A) Armadilhas luminosas tipo CDC, instaladas em abrigos de animais domésticos. (B) aspirador de sucção bucal (modelo Castro) para manipulação de insetos adultos. (C) Potes de criação dos insetos acomodados em estufa do tipo BOD. Fonte: Autora.47

Figura 10. (A) Potes de criação acondicionadas em estufa BOD (Biochemical Oxigen Demand), com temperatura e Umidade Relativa controlada; (B) Alimentação sanguínea dos flebotomíneos em camundongos Swiss (*Mus musculus*) anestesiado; (C) Postura de ovos para obtenção dos insetos adultos nascidos em laboratório; (D) formas imaturas no estágio larval; (E) formas imaturas no estágio de pupa.51

Figura 11. Ilustração da manutenção de flebotomíneos em laboratório, desde a captura dos insetos adultos no campo (P) até o nascimento das primeiras gerações (F1). Fonte: Autora. .51

Figura 12. Desenho experimental da infecção de *Lu. longipalpis* por meio de repasto sanguíneo em animais infectados com *Le. amazonensis* (A); Transmissão de *Le. amazonensis* para camundongo imunossuprimido, via picada de *Lu. longipalpis* previamente alimentados em camundongos experimentalmente infectados (B). 53

Capítulo 1. Maintenance and productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) colony from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis, Northeastern Brazil

Figura 1. Establishment and maintenance of the colony of a population in *Lu. longipalpis* from an endemic area in the Northeast region of Brazil.....61

Figura 2. Fecundity (A) and productivity (B) rates between methods (IF - Individualized Females and GF - Grouped Females). Asterisks indicate statistical differences, ***p - value = 0.0001 and *p - value = 0.0191.....63

Figura 3. Period (in days) for the appearance of each generation (F1 to F10) of individualized and grouped females, from 2017 to 2019.....65

Capítulo 2. Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in mice

Figure 1. Experimental design of *Lutzomyia longipalpis* infection through blood meal in animals infected with *Leishmania amazonensis* (A); Transmission of *Leishmania amazonensis* to immunosuppressed mice via the bite of *Lutzomyia longipalpis* previously fed on experimentally infected mice (B).....69

Figure 2. Confirmation of *L. amazonensis* DNA in *L. longipalpis* fed on infected mice (A): Agarose gel (1%) showing amplified products of 300-350 bp with the primers for *Leishmania ITS1*. M = 100pb marker; PC: positive control; NC: negative control; 211a - 240a: positive samples. (B) Evolutionary scenario of *ITS-1* gene inferred by the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The branch lengths are in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Sequences from our study are highlighted in bold. Sequences from the Mexican complex (including *L. amazonensis* and *L. mexicana*) is indicated by brackets. *Trypanosoma cruzi* is the outgroup.....74

Figure 3. Progression of the lesion observed in the mouse (Animal B) bitten by *Lutzomyia longipalpis* infected with *Leishmania amazonensis*. In (A) 27 and 22 days after the bite; (B) 47 and 42 days; (C) 55 and 50 days; (D) 67 and 62 days concerning groups XI and XII, respectively.....76

Figure 4. Visualization of *Leishmania* in the mouse bitten for infected sandflies. (A) Hematoxylin and eosin staining of a skin lesion showing intense cell degeneration and several

amastigotes (arrows) in degenerate cell cytoplasm. 40x. Scale bar: 20µm. (B) Skin lesion from presenting several amastigotes stained in brown color, confirming the *Leishmania* infection origin of this lesion. Immunohistochemistry, Harris hematoxylin counterstaining, 40c.....78

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Maintenance and productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) colony from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis, Northeastern Brazil

Tabela 1. Number of *Lu. longipalpis* individuals produced in laboratory conditions, for 10 generations, according to the methods used and evolutionary stage. Number of engorged females individualized^a or grouped^b, founders of the respective generations. 62

Tabela 2. Number of eggs laid per female and period (in days) for the development of each immature stage, observed in insects captured in the field (P) and in ten generations of *Lu. longipalpis* reared in the laboratory, from 2017 to 2019.64

Tabela 3. Frequency of adult insects according to sex (male or female) for ten generations, from 2017 to 2019.64

Capítulo 2. Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in mice

Table 1. Proportions of engorged females and proportion of mortality of *Lutzomyia longipalpis* females who performed blood feeding during xenodiagnosis, according to the first (ExpA) and the second (ExpB) blood meals.....72

Tabela 2. Experimental infection rate and number of dissected *Lutzomyia longipalpis* females exposed to the first blood meal (ExpA) of mice infected with *Leishmania amazonensis*.....73

Table 3. Number of females of *Lutzomyia longipalpis* who underwent the second blood meal in two uninfected immunosuppressed mice (A and B) and the total of females diagnosed as positive for *Leishmania* through direct observation of parasites by intestinal dissection and DNA detection by polymerase chain reaction (PCR).....76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CL	Cutaneous leishmaniasis
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LabGeM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
LEV	Laboratório de Entomologia e Vetores
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pb	Pares de bases
UR	Umidade Relativa
h	Hora
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
PAS/ PBF	Proporção de Alimentação Sanguínea/ Proportion of Blood-Feeding
PM	Proporção de Mortalidade/ Proportion of Mortality
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Aspectos gerais de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	23
2.2 Importância vetorial de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	27
2.3 Protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	29
2.4 Interação <i>Leishmania</i> -vetor.....	34
2.5 Capacidade e Competência Vetorial	36
2.6 Criação experimental de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	38
2.7 <i>Lutzomyia longipalpis</i> como possível vetor de parasitos que causam a LTA	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 EXPERIMENTOS DE CAMPO	44
4.1.1 Área de captura dos flebotomíneos	44
4.1.2 Procedimento de captura dos flebotomíneos para o cultivo em laboratório	45
4.2 Obtenção dos animais vertebrados.....	47
4.3 Obtenção e manutenção da cepa de <i>Leishmania amazonensis</i>	48
4.4 Infecção experimental dos camundongos via injeção de <i>Leishmania amazonensis</i>	48
4.5 Imunossupressão dos animais sadios	49
4.6 EXPERIMENTOS DE LABORATÓRIO	49
4.6.1 Criação de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	49
4.6.2 Identificação das fêmeas de flebotomíneos capturadas do campo	52
4.6.3 Ensaios de infecção e transmissão experimental	52
4.6.4 Acompanhamento após os ensaios de transmissão	53
4.6.5 Dissecção de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> ingurgitadas	54

4.6.6 Ensaio moleculares	54
4.6.7 Determinação da carga parasitária	54
4.6.8 Análise Histopatológica	55
4.6.9 Análise imunohistoquímica.....	55
4.6.10 Estudo da Proporção de Alimentação Sanguínea (PAS) e Mortalidade (PM) dos flebotomíneos.....	55
4.6.11 Taxa de infecção experimental dos insetos.....	56
4.7 ANÁLISE DE DADOS	56
4.8 CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 CAPITULO 1:.....	58
6.2 CAPITULO 2:.....	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	103
ANEXO A. Materiais suplementar dos artigos 1 e 2.....	104
Anexo A1. Material suplementar do artigo 1: Maintenance and productivity of a <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera, Psychodidae) colony from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis, Northeastern Brazil.....	104
Anexo A2. Material suplementar do artigo 2: Experimental transmission of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> by <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) in mice	105
ANEXO B. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Experimentação Animal: Estudo da capacidade e competência de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) como vetor de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	107
ANEXO C. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Experimentação Animal: manutenção de <i>Leishmania</i> spp. em hamster (<i>Mesocricetus aratus</i>).....	108
ANEXO D. Carta de responsabilidade enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, informando que o insetário do Laboratório de Insetos Vetores –UFMA tem plenas condições de manutenção de insetos vetores e proteção dos ambientes adjacentes, para realização de experimentos que envolvam competência vetorial, sem risco humano.	109
ANEXO E. Autoria em artigo publicado: Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban Leishmaniasis Transmission Foci in North-Eastern Brazil	110

ANEXO F. Co-autoria em artigo publicado: <i>Leishmania</i> infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis	111
---	------------

APRESENTAÇÃO

A presente tese intitulada “**Estudo da capacidade e competência de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) como vetor de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”** é apresentada em partes: a primeira parte inclui a introdução, a segunda a revisão da literatura, com sete tópicos, sendo eles: Classificação taxonômica e aspectos gerais de *Lu. longipalpis*; Importância vetorial de *Lu. longipalpis*; Protozoários do gênero *Leishmania*; Interação *Leishmania*-vetor; Capacidade e Competência Vetorial; Criação experimental de *Lu. longipalpis* e *Lu. longipalpis* como possível vetor de LTA. A terceira parte compreende a metodologia.

Os resultados apresentados foram estruturados no formato de artigos e compõem os capítulos 1 e 2 “Resultados e Discussão” desta tese. O capítulo 1 compõe o primeiro artigo intitulado “**Maintenance and productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) colony from an area endemic for visceral and cutaneous leishmaniasis in Northeastern Brazil**”, publicado no periódico “*Journal of Medical Entomology*”. O capítulo 2 compõe o segundo artigo intitulado “**Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in mice**”, que será submetido à publicação.

A tese foi elaborada de acordo com as diretrizes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), pelas regras da ABNT. Para os capítulos correspondentes ao artigo 1 e 2, considerou-se as normas da revista *Journal of Medical Entomology* e ao artigo 2, considerou-se as normas da revista *Medical and Veterinary Entomology*.

1 INTRODUÇÃO

O taxon *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) pertence à subfamília Phlebotominae da família Psychodidae dos dípteros (FORATTINI, 1973). É vetor mais importante de *Leishmania (Leishmania) infantum* (Cunha e Chagas 1937), o agente etiológico da leishmaniose visceral americana - LVA (ARRIVILLAGA; FELICIANGELI, 2001).

A área de distribuição geográfica desse vetor no Novo Mundo estende-se desde o México até a Argentina, com registro de ocorrência também no Uruguai (YOUNG; DUNCAN 1994; SALOMÓN et al., 2011; RANGEL; SHAW, 2018). Em função de diversos fatores, a ampla distribuição geográfica ajuda este taxon a ser considerado um complexo de espécies crípticas (BAUZER et al., 2007). Estudos de morfologia, feromônios e isoenzimas corroboram essa hipótese, inclusive, já foi descrita uma espécie nova (*Lu. pseudolongipalpis*) do complexo na Venezuela, com provável papel vetorial (ARRIVILLAGA; FELICIANGELI, 2001). Mesmo no Nordeste do Brasil, existe um alto grau de variação genética entre as populações naturais de *Lu. longipalpis* de diferentes localidades (SILVA et al., 2011). No Brasil esta espécie de flebotomíneo é registrado na maioria dos Estados (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). Apesar de ser encontrada no ambiente silvestre, é uma espécie predominante em áreas de peridomicílios rurais e periurbanos, incluindo grandes centros urbanos (LAINSON; RANGEL, 2005).

Estudos de infecção natural e experimental têm demonstrado a permissividade de *Lu. longipalpis* albergar espécies do gênero *Leishmania* relacionadas com a produção de casos de leishmaniose tegumentar americana - LTA (COELHO et al., 1967; MOLYNEUX et al., 1975; SILVA et al., 1990; WALTERS, 1993; ABDULRAHMAN et al., 1998; STIERHOF et al., 1999; ROGERS et al., 2002; ROGERS et al., 2004; PAIVA et al., 2006, 2010; PEREIRA FILHO et al., 2015; LANA et al., 2015, LARA-SILVA et al., 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017). No entanto, apesar dessa permissividade, estudos de competência vetorial *in vivo* são escassos devido a manutenção colônia de flebotomíneos em laboratório, que demanda muito tempo e além disso é uma tarefa que nem sempre é bem sucedida, o que torna difícil confirmar a capacidade desse inseto como agente transmissor da LTA (ROGERS et al., 2004; SECUNDINO et al., 2012; CECÍLIO et al., 2020).

O fato de se encontrar esta espécie, em ambientes naturais, infectada com *Leishmania* que causa a LTA, é de grande importância, pois esta doença é muito mais frequente no território brasileiro do que a LVA, onde constitui um importante problema de saúde pública devido a

evolução da doença que, dependendo da espécie de *Leishmania* e do estado imune do hospedeiro, pode, além de causar lesões mutilantes, levar o indivíduo à morte (OLIVEIRA et al., 2005).

No Brasil, a LTA é transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos infectados por uma variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas (RANGEL; LAINSON, 2009). No Maranhão já foram encontradas diversas espécies causadoras de LTA, dentre elas *Le. shawi*, *Le. mexicana*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. amazonensis*, *Le. lainsoni* ou *Le. naiffi*, inclusive infectando *Lu. longipalpis* (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017, PEREIRA FILHO et al., 2015, FONTELES et al., 2018). Para se ter uma noção, no período de 2018 a 2020 foram notificados 5.564 casos de LTA, representando o segundo estado da região Nordeste com maior número de casos da doença, atrás apenas para o estado da Bahia. Na Ilha do Maranhão no mesmo período foram notificados 281 casos distribuídos em 2014 (30 casos), 2015 (31 casos), 2016 (37 casos) e 2017 (20 casos) (BRASIL, 2017; SINAN, 2017).

Nas áreas rurais e urbanas de ocorrência de casos tanto de LVA como LTA, frequentemente *Lu. longipalpis* aparece como a espécie de flebotomíneo dominante nesses ambientes. Por isso, há a suspeita de que possa estar envolvida na transmissão de casos de ambas as doenças, sobretudo, quando a frequência de outros flebotomíneos é muito baixa.

Diante disso, esta pesquisa buscou investigar a capacidade e competência vetorial desta espécie para transmitir *Le. amazonensis* em condições de laboratório, o que demandou o estabelecimento de uma colônia de *Lu. longipalpis* cujo desenvolvimento passou a constituir um outro objetivo deste estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais de *Lutzomyia longipalpis*

O táxon *Lu. longipalpis* é um díptero da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, ocorrente nas Américas, tendo sido registrado em áreas tropicais do México à Argentina e Uruguai (LAINSON; SHAW, 1978; WARD, 1985; YOUNG; DUNCAN, 1994; LANZARO et al., 1993; SALOMÓN et al., 2011).

Quando adulto, mede em torno de 3 mm de comprimento, apresentando coloração palha ou castanho claro. É conhecido popularmente nos países de língua inglesa como *sand fly* e nos países de língua latina sulamericanos recebe os designios *chitre*, *palomilla*, *manta blanca*, *quemador*, *pringador*, *jején*, *angoleta* e *titira* (MARCONDES, 2011).

No Brasil é conhecido por diversos nomes populares como, anjinho, cangalhinha, mosquito palha, birigui, flebóti, asa dura, asa branca, cangalha e ligeirinho (WILLIAMS, 1993; CAMARGO; ALEXANDER, 1999; BARCINSKI, 2003; DIAS, 2011). No Maranhão possui diferentes designios, sendo conhecido como tatuquira, tatuíra (na região amazônica), péla-égua (região do baixo curso do rio Parnaíba), arrupiado e furrupa (Ilha de São Luís) (REBÊLO, 1997).

De acordo com seu desenvolvimento, *Lu. longipalpis* é classificado como inseto holometábolo, cujo ciclo de vida compreende as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais (L1-L4), pupa e adulto (FORATTINI, 1973; DIAS, 2011; MONTEIRO, 2012). Em estudo experimental, em condições laboratoriais, realizado em Betim, MG, foi observado que o seu ciclo de desenvolvimento dura em média 29 dias (BRAZIL et al., 1997) (Figura 1).

Os ovos são pequenos, quase microscópicos (0,3-0,5 mm de comprimento e 0,1-0,15 mm de largura) e possuem forma ovoide ou elipsóide. Cada fêmea adulta é capaz de realizar uma postura de dois a 80 ovos, com média de 28 ovos por fêmea, e normalmente, sua eclosão ocorre de 5 a 17 dias após a postura, em condições ambientais favoráveis (FORATTINI, 1973; KILLICK-KENDRICK et al., 1977; FERRO et al., 1998; MORALES et al., 2005; DIAS, 2011). Mas alguns podem ter um período de incubação estendido de 30 dias ou mais, especialmente se expostos a condições desfavoráveis (LAWYER, 2017) (Figura 1A).

Uma vez eclodidas, as larvas, que são de difícil visualização a olho nu, são pequenas (< 12 mm), claras, vermiformes e passam por quatro estádios (fases de crescimento). Enquanto as larvas de outros psicodídeos são aquáticas, as dos flebotomíneos são terrestres, e por isso razão, os criadouros naturais são difíceis de ser encontrados (SHERLOCK 2003). As larvas

alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo. O corpo é dividido em cabeça, três segmentos torácicos e nove segmentos abdominais, que no decorrer do desenvolvimento aumentam seu tamanho. Elas podem ser encontradas no solo, em tocas de animais, em folhas mortas e em outros micro-habitats úmidos (HANSON, 1961; YOUNG; DUNCAN, 1994; TESH; GUZMAN, 1996; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Ainda, caso a situação climática seja desfavorável ao seu desenvolvimento, as larvas têm a capacidade de entrar em diapausa, o que faz com que quando o clima se torne favorável, o desenvolvimento larvário progrida (TESH, 1988) (Figura 1B).

Antes de as larvas se transformarem em pupas, cerca de um ou dois dias, as larvas de 4º instar deixam de se alimentar e procuram algum suporte sólido que serve de substrato para a fixação da pupa. Esta permanece ligada a um substrato, podendo ser uma folha morta, pedra ou outro objeto (YOUNG; DUNCAN, 1994). A pupa tem 3-4 mm de comprimento, possui tonalidade branco-amarelado, é dividida em cefalotórax e abdômen, fica aderida a um substrato endurecido até o momento da eclosão, que dependendo da espécie esse estágio pode durar até uma média de 15 dias (FERRO et al., 1998), quando sua coloração assume um tom mais escuro (BRAZIL; BRAZIL, 2003). A fase de repouso dura de sete a 12 dias e os machos, habitualmente, emergem antes das fêmeas (YOUNG; DUNCAN, 1994) (Figura C).

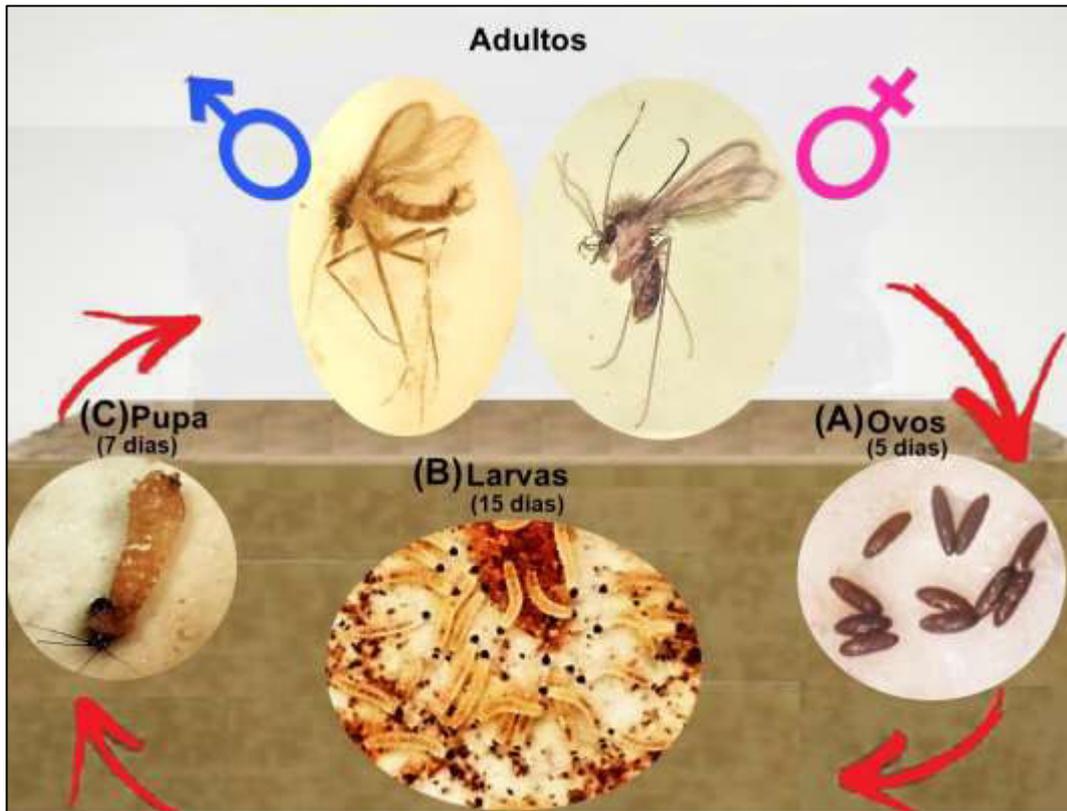


Figura 1. Representação do ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis* com as seguintes fases: ovos (A), larvas (B), pupa (C) e adultos, macho e fêmea. Fonte: Fotos retiradas da colônia de *Lu. longipalpis* do insetário do LEV, UFMA, Brasil.

Fêmeas e machos necessitam de carboidratos como fonte de energia para exercerem suas atividades de voo, acasalamento, postura de ovos e garantirem sua sobrevivência. Eles se alimentam de derivados de açúcares de origem vegetal, retirando do néctar de flores e frutos, seivas de plantas e secreções de afídeos (BRAZIL; BRAZIL, 2003; SCHLEIN; WARBURG, 1986). Os flebotomíneos possuem dimorfismo sexual evidente, como o tamanho da probóscide, que geralmente é maior na fêmea e adaptada para picar e sugar. Os últimos segmentos abdominais no macho constituem-se de apêndices bem desenvolvidos e com genitália externa, enquanto na fêmea são mais discretos e com formato arredondado e genitália interiorizada (Figura 2). Também apresentam diferenças no comportamento alimentar, pois a hematofagia restringe-se às fêmeas, necessária para a produção e maturação de seus ovos (FORATTINI, 1973; BRAZIL; BRAZIL, 2003; KILLICK-KENDRICK, 1990; WARBURG; FAIMAN, 2011). Todavia, machos foram observados se alimentando de sangue em condições laboratoriais, mas sem exibir comportamento picador-pungitivo (TESH, 1988).



Figura 2. Flebotomíneos adultos (*Lutzomyia longipalpis*). A esquerda, macho com extremidades posterior bem desenvolvidos em formato de uma garra nos últimos seguimentos abdominais e a direita fêmea com últimos seguimentos mais discretos conferindo um aspecto arredondado. Fonte: Autora.

As fêmeas de flebotomíneos praticam a hematofagia em diversos grupos de animais silvestres, tais como: mamíferos, aves, anfíbios e répteis. Porém, com a degradação do ambiente silvestre, animais domésticos como galinha, porco, cão e o cavalo podem também ser fonte alimentar para os flebotomíneos (FALQUETO et al., 1986; FALQUETO et al., 1987; YOSHIDA et al., 1988; RANGEL et al., 1990). A alimentação ocorre principalmente durante o período crepuscular em que um grande número de insetos se agrega perto dos hospedeiros (QUINNELL; DYE, 1994). Apesar do repasto sanguíneo ser realizado somente pelas fêmeas, os machos também são atraídos para os hospedeiros onde demarcam território individual e esperam pelas fêmeas para o acasalamento (JARVIS; RUTLEDGE, 1992). Essa atração aos vertebrados ocorre em resposta a sinais químicos emitidos pelos hospedeiros, como o CO₂ ou outros cairomônios (NIGAN; WARD, 1991; OSHAGHI et al., 1994; PINTO et al., 2001). Em experimentos de campo, por exemplo, Hamilton e Ramsoondar (1994) observaram que diferentes populações de *Lu. longipalpis* (colônias originárias de Jacobina e Lapinha, estado da Bahia, Brasil) apresentaram respostas diferenciadas aos odores humanos.

A distribuição geográfica e abundância do taxon varia, de acordo com as características ambientais e sazonais das diferentes regiões, dependente de fatores como barreiras físicas,

precipitação pluviométrica, vegetação, luminosidade e abundância de hospedeiros vertebrados (ARIAS et al., 1985). A espécie *Lu. longipalpis* tem sido estudada em diversos ecossistemas brasileiros, tais como áreas de florestas primárias na Amazônia (LAINSON et al., 1990), pantanal mato-grossense (RIBEIRO; MISSAWA, 2002; GALATI et al., 2003), mas, sobretudo, em matas secundárias (BARROS et al., 2000) e cerrados (RIBEIRO; MISSAWA, 2002; MARTIN; REBÊLO, 2006).

Esse táxon foi colonizando gradualmente os ambientes rurais e no final dos anos 1980 iniciou sua introdução no ambiente urbano, sendo encontrado principalmente no intra e peridomicílio nas periferias das grandes cidades (LAINSON; RANGEL, 2005; BRAZIL, 2013). No estado do Maranhão, diversos trabalhos de levantamentos entomológicos têm demonstrado que *Lu. longipalpis* apresenta-se como a espécie de flebotomíneo mais abundante, encontrada nos peridomicílios das residências rurais e urbanas, (REBÊLO et al., 2010; SILVA et al., 2012; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2015; FILHO et al., 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017; RIBEIRO-DA-SILVA, 2019).

Na Ilha de São Luís, *Lu. longipalpis* comporta-se como uma espécie anual, ocorrendo em alta frequência em todos os meses do ano, porém, mais abundante no período chuvoso (57,2%) do que no seco (42,8%) (REBÊLO, 2001). Segundo o autor, ocorre a noite inteira, sendo mais frequente entre 18h e 22h no peridomicílio, e entre 20h e 2h no intradomicílio.

2.2 Importância vetorial de *Lutzomyia longipalpis*

Lu. longipalpis é o vetor mais importante da LVA, uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, pois afeta as vísceras (ou órgãos internos), sobretudo fígado, baço, linfonodos e medula óssea, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2014). Em praticamente todas as áreas de ocorrência desta doença, *Lu. longipalpis* tem sido identificada como a espécie vetora (LAINSON; SHAW, 1987). Porém, vários autores (SANTOS et al., 1998; GALATI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2017) sugerem a participação de *Lu. cruzi* na transmissão da LVA em Corumbá, estado do Mato Grosso do Sul, principalmente por conta do seu predomínio em área urbana, sendo encontrada tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio e também por sua antropofilia. Embora as fêmeas dessas duas espécies sejam idênticas, os machos podem ser distinguidos por diferenças na genitália. Além disso, dados sobre os polimorfismos moleculares do gene *period* de *Lu. cruzi* indicam esta espécie como mais uma espécie irmã dentro do complexo *Lu. Longipalpis* (SANTOS et al., 1998). Estes mesmo autores destacam a ocorrência

de *Lu. forattinii* em ambiente domiciliar na mesma área, chamando a atenção, por apresentar estreito grau de parentesco com *Lu. cruzi* e *Lu. longipalpis*.

Com estudos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem aumentado os estudos sobre infecção natural de flebotomíneos, com a detecção de fragmentos de DNA de *Leishmania* no inseto. O inseto *Lu. longipalpis*, em ambiente natural, já foi detectado fragmentos de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LTA (*Le. shaw*, *Le. mexicana*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. amazonensis*, *Le. Lainsoni* e *Le. naiffi*) em alguns estados do Brasil, como, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (PAIVA et al., 2006, 2010; SOARES et al., 2010; LANA et al., 2015, LARA-SILVA et al., 2015) e Maranhão (PEREIRA FILHO et al., 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017; FONTELES et al., 2018). Essas espécies de *Leishmania* são os agentes etiológicos da LTA, transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos (RANGEL; LAINSON, 2009).

A LTA é outro tipo de leishmaniose, uma doença infecciosa negligenciada, zoonótica, não contagiosa, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Dependendo da espécie de *Leishmania*, causam formas clínicas que afetam a pele e as mucosas, que dependendo do estado imunológico do hospedeiro, pode acometer, também, as vísceras (BARRAL et al., 1986; 1991; SHERLOCK, 1996; SACKS; KAMHAWI, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; DUJARDIN et al., 2008; ALVAR et al., 2008; 2012; ZIJLSTRA, 2014; BRASIL, 2015; PAHO/WHO, 2019).

A manifestação clínica das leishmanioses (LVA e LTA) estão intimamente relacionada ao estado do sistema imunológico do hospedeiro (SAMPAIO et al., 2002), uma vez que o aumento nos números de casos por leishmanioses está relacionado a pacientes com coinfeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes que fazem uso de medicamentos imunossupressores e pacientes com morbidade associada à desnutrição e a infecções por helmintos (GAMA et al., 1998; AKUFFO et al., 2018; SOARES et al., 2020).

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, espécie alvo da presente tese, é o agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa, uma doença de difícil tratamento que pode acarretar deformidades e sequelas, além da parte psicológica do paciente que é muitas vezes afetada em virtude das mutilações e do preconceito, considerada assim um problema de saúde pública (COSTA, 2005; DIAS et al. 2007; NEVES, 2005).

O flebotomíneo *Brichromomyia flaviscutellata* é vetor comprovado de *Le. amazonensis* em ambiente natural. Porém, várias espécies de flebotomíneos que são conhecidos como vetores

permissivos, incluindo *Lu. longipalpis*, conseguem se infectar e sustentar a infecção por esse parasito (KILLICK-KENDRICK et al., 1977).

Levando-se em consideração que as leishmanioses são endêmicas, com elevado registro de número de casos no Maranhão, é importante destacar que a detecção de DNA de diferentes espécies de *Leishmania*, inclusive de *Le. amazonensis* em *Lu. longipalpis*, é preocupante, pois demonstra a circulação concomitante do parasito e do inseto no Estado (GUIMARÃES et al., 2017). Além disso esta espécie de flebotomíneo é a mais adaptada ao convívio com o homem e os animais domésticos (REBÊLO, 2001).

2.3 Protozoários do gênero *Leishmania*

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* Ross, 1903, que compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo simples e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto (CARDOSO; CABRAL, 1998; MARSELLA; GOPEGUI, 1998). As diversas espécies do gênero *Leishmania* são parasitos heteroxenos, pois necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo de vida, um vertebrado (mamíferos, incluindo seres humanos) e outro invertebrado pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (YOUNG; DUCAN 1994; VASSILIOS, 1993; GRIMALDI JR; TESH, 1993) (Figura 3).

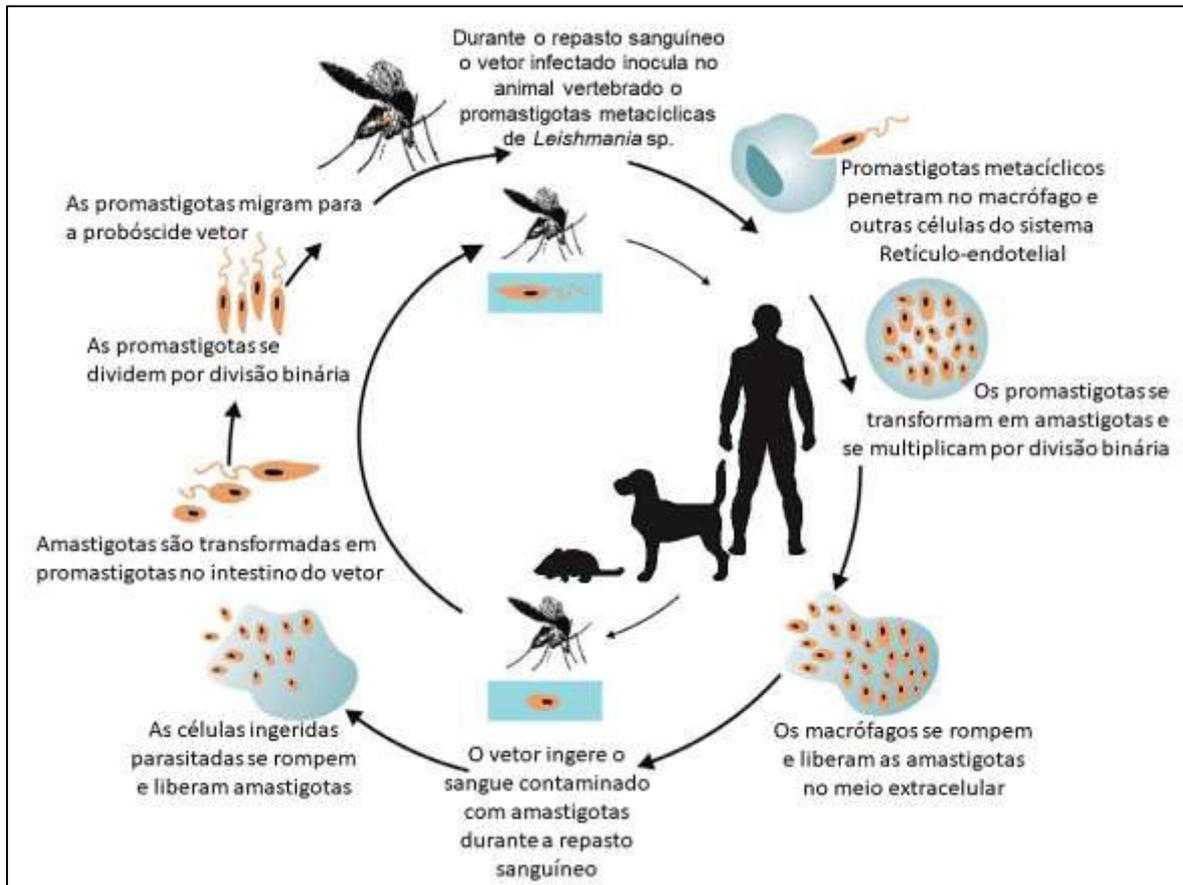


Figura 3. Ciclo de vida de protozoário parasita do gênero *Leishmania* das Américas. Fonte: WHO, 2019, adaptado da Universidade Federal de Goiás.

Os reservatórios, que mantêm o parasito, são animais vertebrados em ambiente selvagem e, portanto, os vetores se infectam neles e o ciclo de transmissão pode persistir. Geralmente há um reservatório principal para cada espécie de *Leishmania* em cada surto, mas outros mamíferos na mesma área, também podem se tornar infectados e tornar-se reservatórios secundários ou acidentais (OPS, 2019). Os reservatórios são uma gama variada de mamíferos domésticos e silvestres. No caso da LVA, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório doméstico e as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) a principal fonte de infecção silvestre, enquanto o gambá ou mucura (*Didelphis albiventris*) é suspeito de funcionar como reservatório sinantrópico, ou seja, animais silvestres que se adaptaram a viver junto aos animais domésticos a procura de alimento (LAINSON, 2010).

Em relação à LTA os roedores e xenartros (preguiça, tamanduá e tatu) são considerados os principais reservatórios silvestres; e no ambiente domésticos há relatos de infecção natural

em cães, equinos e suínos (REITHINGER et al., 1999; FEITOSA et al., 2012; BRAZIL et al., 1987) (Figura 4).



Figura 4. Reservatórios domésticos (A) e silvestres (B a D) de protozoário parasito do gênero *Leishmania* Fonte: OPS, 2019.

A classificação em subgêneros de *Leishmania* está relacionada com o seu comportamento de desenvolvimento no trato digestório do vetor: Hipopilária, com desenvolvimento restrito ao intestino posterior do flebotomíneo vetor; Peripilária, com desenvolvimento no intestino posterior, porém, há migração do parasito para os intestinos médio e anterior; e Suprapilária, com desenvolvimento dos parasitos restrito ao intestino médio do flebotomíneo vetor (LAINSON e SHAW, 1987).

O subgênero *Viannia* contém os parasitos com o tipo de desenvolvimento Peripilária, como, por exemplo, a espécie *Le. (Viannia) braziliensis*. O subgênero *Leishmania* possui as espécies com o tipo de desenvolvimento Suprapilária, por exemplo, *Le. (L) infantum*; enquanto

o subgênero *Sauroleishmania* representa as espécies como tipo de desenvolvimento Hipopilária, que apresentam répteis como hospedeiro vertebrado (Figura 5).

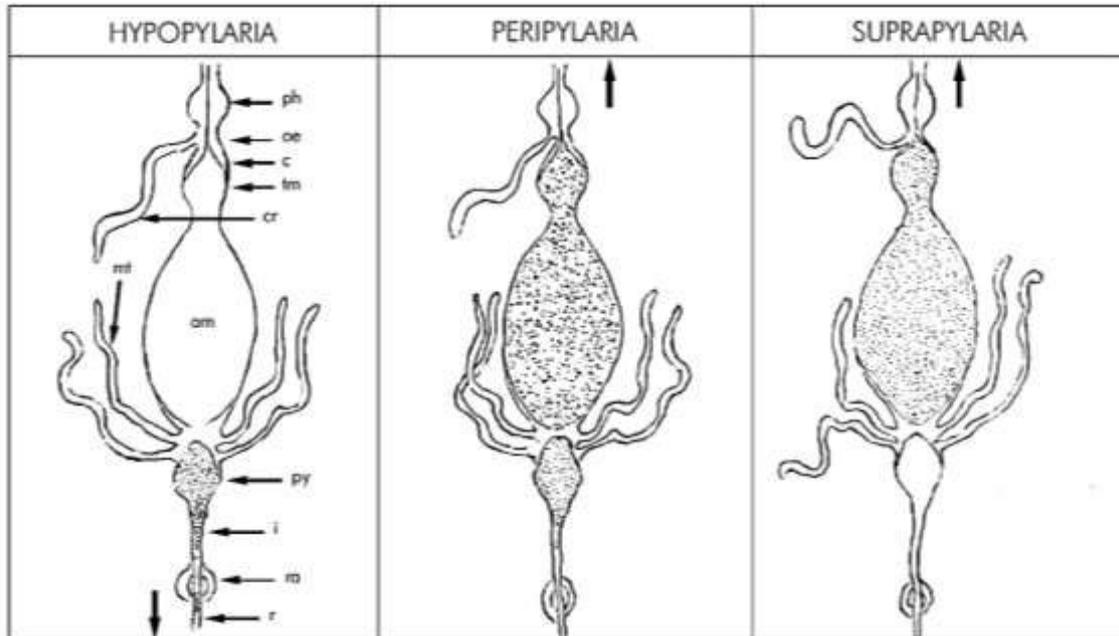


Figura 5. Classificação básica das espécies de *Leishmania*, determinada pelo seu padrão de desenvolvimento no tubo digestório de flebotomíneos. Adaptado de Lainson e Shaw (1979). LEGENDA: ph = faringe; oe = esôfago; c = cárdia; tm = intestino médio torácico; cr = papo (crop); mt = túbulos de Malpighi; am = intestino médio abdominal; py = piloro; i = íleo; ra = ampola retal; r = reto.

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras das leishmanioses em humanos e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil já foram identificadas oito espécies de *Leishmania* associadas à infecção no homem, sendo seis do subgênero *Viannia*: *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* e as espécies que foram identificadas somente nas regiões Norte e Nordeste, a *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) lindenberg* e *Le. (V.) shawi*. E duas do subgênero *Leishmania*: *Le. (Leishmania) amazonensis* e *Le. (Le.) infantum* (sinonímia de *Le. chagasi*) (LESSA et al., 2007; BRASIL, 2010). Todas essas espécies de parasitos causam a LTA, exceto *Le. (Le.) infantum*, que causa a LVA (BRASIL, 2010). Ambos os subgêneros apresentam duas formas evolutivas, a forma amastigota e a forma promastigota (LAINSON; SHAW, 1987). O quadro a seguir apresenta as principais espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, as formas clínicas da doença e seus respectivos flebotomíneos vetores (Quadro 1).

Quadro 1. Principais espécies de *Leishmania* que infectam o homem, encontradas no Brasil, as formas clínicas da doença e respectivos flebotomíneos vetores.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica da doença	Espécies vetoras (Classificação de Galati 2003)
Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf Janova, 1982)		
<i>Le. (Le.) infantum</i> (Nicole, 1908)	Leishmaniose Visceral	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lu. cruzi</i> (Mangabeira 1938) • <i>Lu. longipalpis</i> (Lutz e Neiva 1912) • <i>Lu. evansi</i> (Nuñez-Tovar 1924)
<i>Le. (Le.) amazonensis</i> (Lainson e Shaw, 1972)	Leishmaniose Cutânea e Cutânea - Difusa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Brichromomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira 1942)
Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1987)		
<i>Le. (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Leishmaniose Cutânea e Cutaneomucosa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes e Coutinho 1939) • <i>Migonemyia migonei</i> (França 1920) • <i>N. intermedia</i> (Lutz e Neiva 1912) • <i>N. neivai</i> (Pinto 1926) • <i>Psychodopygus complexus</i> (Mangabeira 1941) • <i>P. hirsutus hirsutus</i> (Mangabeira 1942) • <i>P. squamiventris</i> (Lutz e Neiva 1912) • <i>P. wellcomei</i> (Fraiha, Shaw e Lainson 1971)
<i>Le. (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	Leishmaniose Cutânea e Cutaneomucosa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N. anduzei</i> (Rozeboom 1942) • <i>N. umbratilis</i> Ward e Fraiha 1977
<i>Le. (V.) Lindenbergi</i> (Silveira, Ishikawa e de Souza, 2002)	Leishmaniose Cutânea	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N. antunesi</i> (Coutinho 1939)
<i>Le. (V.) panamensis</i> (Lainson e Shaw, 1954)	Leishmaniose cutânea	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lu. yuilli yuilli</i> Young e Porter 1972
<i>Le. (V.) naiffi</i> (Lainson e Shaw, 1989)	Leishmaniose cutânea	<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. ayrozai</i> (Barretto e Coutinho 1940) • <i>P. davisii</i> (Root 1934) • <i>P. paraensis</i> (Costa Lima 1941)
<i>Le. (V.) lainsoni</i> (Silveira, Shaw, Braga e Ishikawa, 1987)	Leishmaniose cutânea	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> (Mangabeira 1942)

Segundo Rangel e Lainson (2009), o número crescente de espécies de *Leishmania* neotropicais sendo descritas é em grande parte devido ao isolamento dos parasitos de casos de leishmaniose humana. Há, no entanto, várias espécies que ainda não são conhecidas por infectar o homem, muito provavelmente porque seus vetores não são atraídos por ele: exemplos notáveis são *Le. (Le.) hertigi* e *Le. (Le.) deanei* de porco-espinhos, *Le. (Le.) enriettii* de porquinhos-da-índia e *Le. (V.) utingensis* da espécie de flebotomíneo *Viannamyia tuberculata*. Ainda de acordo com esses autores, há várias espécies de *Leishmania* para serem descobertas com a continuação de trabalhos voltados para a dissecação de um grande número

de flebotomíneos não antropofílicos, com o isolamento e caracterização de quaisquer parasitos detectados.

2.4 Interação *Leishmania*-vetor

O processo de interação do parasito com o hospedeiro vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo está apta a se alimentar de sangue para o desenvolvimento dos seus óvulos. Durante o repasto a fêmea, eventualmente, pode ingerir o protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado infectado. O ciclo de vida da *Leishmania* nos insetos vetores é extracelular, ou seja, os parasitos se desenvolvem livres na luz do trato digestório (NIEVES; PIMENTA, 2000; SACKS, 2001).

As amastigotas, presentes no hospedeiro vertebrado, podem ser ingeridas livres ou dentro de macrófagos. Essas formas são rapidamente direcionadas ao intestino médio do inseto e envoltas pela matriz peritrófica, junto ao bolo sanguíneo (WALTERS et al., 1993; PIMENTA et al., 1997; SECUNDINO et al., 2005). Após um período de 12 a 20 horas e dentro do bolo alimentar, as amastigotas se diferenciam em promastigotas. As promastigotas são formas altamente multiplicativas, alongadas, flageladas e extremamente móveis. Posteriormente, essas promastigotas iniciam o processo de metaciclogênese, transformando-se em formas promastigota procíclica para meta-cíclica, forma infectante ao vertebrado (SACKS; PERKINS, 1985). Além dessas formas, dentro do vetor também são encontradas as formas nectomona, haptomona e paramastigota, conforme classificação de Lawyer et al. (1990).

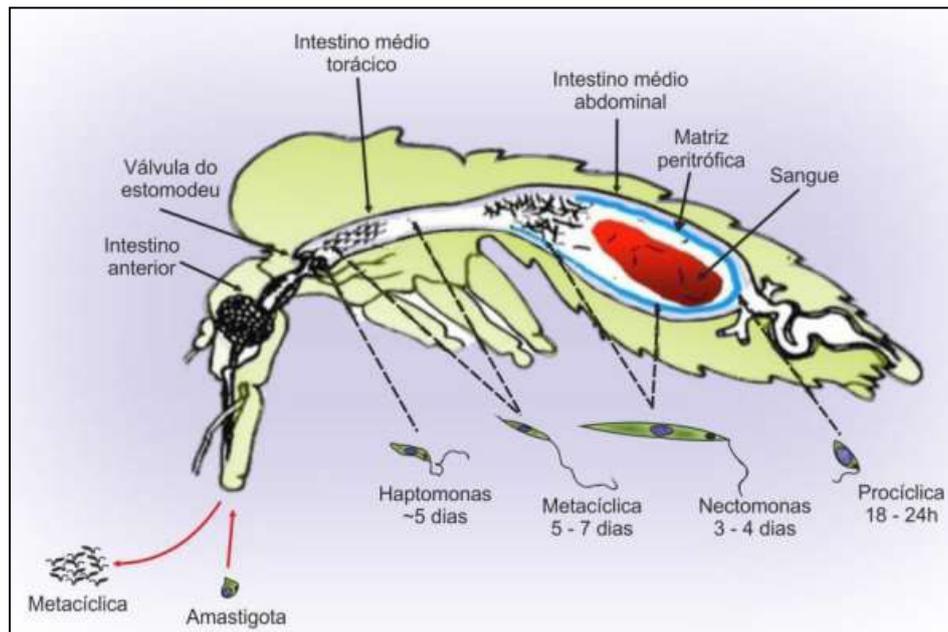


Figura 6. Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor. Fonte: Sacks e Kamhawi, 2001.

As barreiras que o parasito precisa enfrentar ao ser ingerido por um vetor são: (a) resistirem às atividades enzimáticas digestivas presentes no intestino médio do inseto no momento da digestão sanguínea; (b) escaparem da matriz peritrófica que envolve o bolo alimentar; (c) aderirem ao epitélio intestinal do inseto no momento da excreção do resto alimentar e (d) completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, finalizando com o desenvolvimento e diferenciação em formas infectantes (PIMENTA et al. 2003).

Antes do advento das ferramentas moleculares e estudos de infecção experimental a relação inseto-parasito parecia ser apenas espécie-específica, de maneira que em cada flebotomíneo vetor, desenvolve-se determinada espécie ou cepa de *Leishmania* (WALTERS et al., 1989; PIMENTA et al., 1992; RANGEL et al., 1992; GONTIJO et al., 1998; KATO et al., 2010; BRASIL, 2014). Esse comportamento específico ocorre devido a uma interação entre proteínas presentes no intestino médio dos flebotomíneos com moléculas de superfície do parasito, em especial lipofosfoglicanos (LPG), sugerindo que esta interação é determinante para a capacidade vetorial do inseto (KILLICK-KENDRICK, 1999). Porém, com os estudos moleculares e infecções experimentais, várias espécies de flebotomíneos tem sido considerada permissivas, ou seja, sustentam o desenvolvimento de mais de uma espécie de *Leishmania*. Este tipo de comportamento foi caracterizado como “Vetor Permissivo”, de modo que o

desenvolvimento do parasito nessas espécies ocorre de maneira diferente do comportamento específico. O comportamento permissivo está relacionado à presença da fração terminal da glicoproteína N-acetil-galactosamina no intestino médio do vetor e à ocorrência de lectinas na superfície da *Leishmania*, portanto, independente do LPG. Esta nova modalidade de ligação tem implicações importantes para a transmissão e evolução do parasito, uma vez que pode contribuir para a dispersão de *Leishmania*, devido à sua adaptação em novos vetores (MYSKOVA et al., 2007; VOLF; PECKOVA, 2007).

Uma das espécies de flebotomíneos mais importante na transmissão de leishmaniose nas Américas é *Lu. longipalpis*. Este flebotomíneo é considerado vetor permissivo, pois tem sido bastante utilizado em laboratório como modelo experimental, sendo infectado com diferentes espécies de *Leishmania* (MYSKOVA et al., 2007; SVÁROVSKÁ et al., 2010; SECUNDINO et al., 2010). Além disso, tem sido encontrado naturalmente infectado com espécies de *Leishmania* que causam a LTA (PAIVA et al., 2006; 2010; LANA et al., 2015; LARA-SILVA et al., 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017; RIBEIRO-DA-SILVA et al., 2019).

Porém, o comportamento permissivo deste flebotomíneo não é suficiente para caracterizá-lo como transmissor de LTA. Assim, são necessários trabalhos experimentais *in vivo* sobre a competência vetorial de *Lu. longipalpis* para transmitir LTA. Esse tipo de pesquisa é mais difícil de se realizar porque são necessários ensaios experimentais, com a utilização de cobaias, onde a questão ética no trato com animais tem sido bastante debatida. Além de ser um trabalho laborioso, demanda tempo, pois tem que manter colônia de flebotomíneos em laboratório, uma tarefa que nem sempre é bem-sucedida.

2.5 Capacidade e Competência Vetorial

Vetores específicos e permissivos possuem capacidade vetorial, que pode ser designada como a capacidade que um inseto hematófago tem de sustentar uma infecção de um determinado patógeno (VOLF; PECKOVA, 2007) (Figura 7A). Entretanto, para analisar a capacidade vetorial de um inseto, deve-se considerar alguns parâmetros envolvidos no sucesso do vetor em adquirir o parasito e manter a infecção no seu intestino, tais como: analisar a densidade do vetor em relação ao hospedeiro, a atratividade ao hospedeiro, a proporção de fêmeas que exerceram a hematofagia, a probabilidade de sobrevivência estimada em campo, a duração do ciclo gonotrófico, a duração do período de incubação extrínseco e a proporção de fêmeas infectadas com formas infectivas (GARRET-JONES 1964; REISEN, 1989).

A competência vetorial envolve outros passos evolutivos, não apenas a aquisição e manutenção dos parasitos, mas o ato de transmiti-los em condições naturais (Figura 7B). Nesse caso, um vetor passa a ser “incriminado” como o agente transmissor de um determinado patógeno (READY, 2013; VOLF; PECKOVA, 2007).

Entre os parâmetros que norteiam a incriminação dos flebotomíneos como vetores de *Leishmania* para a população humana, destacam-se (1) o comportamento antropofílico; (2) a distribuição geográfica coincidente com a da doença; (3) potencial para infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana; (4) o grau de relacionamento com os reservatórios e com o homem; (5) a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito; (6) a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório e (7) a capacidade desses insetos se infectarem e a competência para transmitir experimentalmente o parasito por meio da picada em modelos experimentais (KILLICK-KENDRICK; WARD, 1981; KILLICK-KRNDRIC, 1990).

Não há dúvidas de que *Lu. longipalpis* é o vetor mais importante da *Le. infantum* nas Américas e a única espécie de flebotomíneo que atende a todos os critérios estabelecidos para a competência vetorial para leishmanioses, propostos por Kilik Kendrick (1990) e aceitos e adotados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

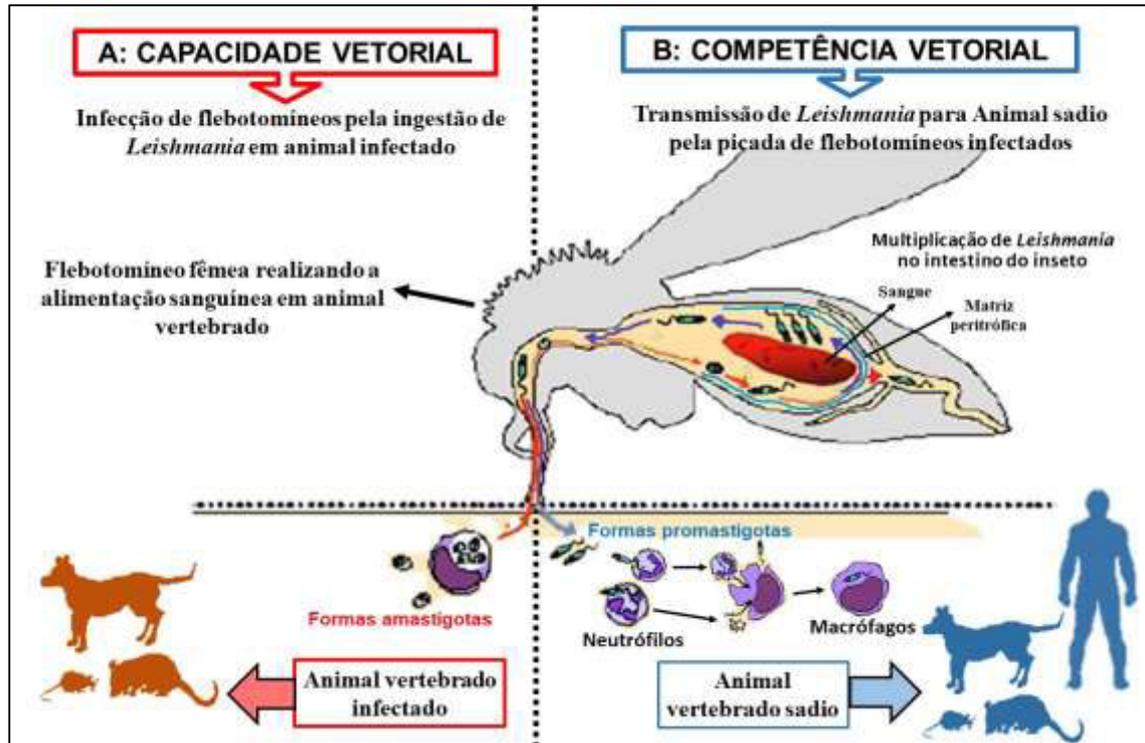


Figura 7. Desenho esquemático simplificado da capacidade (A) e competência (B) vetorial de um flebotomíneo se infectar e transmitir *Leishmania* spp. para animais vertebrados. Fonte: adaptado por Ribeiro-da-Silva, R. C. 2021.

2.6 Criação experimental de *Lutzomyia longipalpis*

O estabelecimento de colônias de espécies de flebotomíneos é de grande importância, pois permite que sejam feitas observações que não são possíveis no ambiente natural. Uma vez que as larvas de flebotomíneos se desenvolvem no solo, é extremamente difícil, ou mesmo impossível, estudar sua biologia no ambiente natural (HANSON, 1961; YOUNG; DUNCAN, 1994; FERRO et al., 1997). Devido à sua importância como vetor da LVA e a possibilidade de transmitir agentes etiológicos da LTA, o estabelecimento de colônias desses insetos em laboratório é essencial para a compreensão da sua biologia, relações parasito-vetor-hospedeiro e epidemiologia dessa doença.

Várias técnicas para a criação de flebotomíneos em laboratório têm sido descritas ao longo dos anos e em diversas partes do mundo (DEANE; DEANE, 1955, SHERLOCK; SHERLOCK, 1959; MANGABEIRA, 1969; KILLICK-KENDRICK et al., 1973; KILLICK-KENDRICK et al., 1977; READY 1978, 1979; MODI; TESH 1983; BUESCHER et al., 1984; KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1991; MODI, 1997). Porém, existem poucos laboratórios dedicados a esta laboriosa tarefa, de modo que poucas espécies são mantidas com

sucesso e em número suficiente para fins experimentais. A colonização e a manutenção das espécies *Phlebotomus papatasi* e *Lu. longipalpis* em laboratório são consideradas as mais “fáceis” e esse é o motivo principal pelo qual essas duas espécies são utilizadas na maioria dos trabalhos sobre interação vetor-*Leishmania* (PIMENTA et al., 2012).

Os flebotomíneos demandam cuidados especiais para o estabelecimento e manutenção de colônias, e o início dessa tarefa é muito mais difícil do que a manutenção de colônias já estabelecidas (TESH et al., 1971; KILLICK-KENDRICK, 1978; YOUNG et al., 1981; YOUNG; PERKINS, 1984; COMER et al., 1994). O estudo de Lawyer et al. (2017) compara as principais colônias de flebotomíneos do mundo, indicando informações necessárias para a padronização e manutenção de colônias de flebotomíneos.

A espécie *Lu. longipalpis* possui extensa distribuição geográfica de forma descontínua (YOUNG; DURAN, 1994). Isso se deve a existência de barreiras geográficas, ambientais e climáticas e ao curto raio de voo do vetor (ALEXANDER et al., 1998). Esse isolamento por distância reduz o fluxo gênico entre as populações (BAUZER et al., 2007). Nesse contexto, *Lu. longipalpis* é considerado um complexo de espécies (LANZARO et al., 1993). As populações desta espécie da América Central e do Sul apresentam um grande polimorfismo no comportamento, morfologia e caracteres bioquímicos (WARD et al., 1983; HAMILTON et al., 1996; DUJARDIN et al., 1997; MUKHOPADHYAY et al., 1998; DIAS et al., 1998; YIN et al., 1999). Por exemplo, no estudo de Dias et al. (1998) ao compararem quatro populações de *Lu. longipalpis* de regiões geográficas distintas ao nível molecular por RAPD-PCR, um primer distinguiu uma população (Ilha do Marajó, Pará, Brasil) de outras três (Gruta da Lapinha, Minas Gerais, Brasil; Melgar, Departamento de Tolima, Colômbia e Libéria, Província de Guanacaste, Costa Rica).

Foi demonstrado por Casanova et al. (2015), que a população de *Lu. longipalpis*, de diferentes localidades do Estado de São Paulo, que emite o feromônio (S)-9-methylgermacrene-B pode ter maior capacidade vetorial que a população que emite cembrene-1. Nesse contexto, pode ser que a competência e a capacidade vetorial desses insetos variem não só entre diferentes espécies, como também entre diferentes populações geográficas da mesma espécie. Nesse sentido, será que as populações de *Lu. longipalpis* nas diferentes regiões do Brasil possuem comportamento de competência vetorial diferentes entre populações? Nesse contexto, qualquer nova colônia de flebotomíneos estabelecida em laboratórios de diferentes regiões do Brasil se torna importante. A partir delas pode-se compreender a susceptibilidade para parasitos de

Leishmania que diferentes populações de *Lu. longipalpis* possa vir a ter, e se esta espécie de flebotomíneo pode estar envolvida como um vetor secundário de LTA em algumas regiões do país, como o Nordeste, onde reservatórios sinantrópicos de *Leishmania* interagem com animais domésticos.

2.7 *Lutzomyia longipalpis* como possível vetor de parasitos que causam a LTA

Além da permissividade de *Lu. longipalpis* para as diferentes espécies de *Leishmania* que causam a LTA, existem outros parâmetros que norteiam a incriminação desta espécie como possível vetores de parasitos que causam a LTA. São importantes os registros desse inseto naturalmente infectado com diferentes espécies de *Leishmania* em áreas com constante processo de urbanização e com registro de casos de LTA. Vários trabalhos ressaltam a capacidade de adaptação de *Lu. longipalpis* aos ambientes antrópicos, intra e peridomiciliares (DEANE; DEANE, 1957; DE SOUZA et al., 1981; RESENDE et al., 2006; DIAS et al., 2007; RIBEIRO-DA-SILVA et al., 2019). Este vetor é uma das espécies de flebotomíneos que se adaptaram ao ambiente domiciliar, evidenciada na grande infestação desse ambiente e na habilidade de se alimentar em diversos animais domésticos e sinantrópicos (DEANE; DEANE, 1957; FORATTINI, 1973; RANGEL; LAINSON, 2003; DIAS et al., 2003; GONTIJO, 2004; BARATA et al., 2005; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

Rebêlo et al. (1999) ao estudarem espécies de flebotomíneos da Ilha do Maranhão e Vianna et al. (2016) em Minas Gerais, verificaram que, de todas as espécies de flebotomíneos, *Lu. longipalpis* é a mais abundante no ambiente domiciliar e provavelmente a melhor adaptada ao convívio com o homem e os animais domésticos. Os fatores que favorecem a proliferação de populações desse vetor nas áreas urbanas incluem a redução da cobertura vegetal original, expansão das cidades acompanhada de pouco investimento no saneamento básico e decréscimo na qualidade ambiental. A presença de animais sinantrópicos (potenciais reservatórios) convivendo com animais domésticos permite que *Lu. longipalpis* funcione como elo no processo de transmissão da *Le. infantum* (REBÊLO, 2001).

Outro aspecto observado nessa espécie, em ambiente natural, é a resistência comportamental em comparação com as outras espécies de flebotomíneos, pois *Lu. longipalpis* ocorre rigorosamente em todos os meses do ano. Isso demonstra a resistência desta espécie a variações climáticas (temperatura, umidade, pluviosidade) e sazonais, com ocorrência tanto no período chuvoso como seco (MACEDO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; HOLCMAN et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; VIANNA et al., 2016; SANTINI et al., 2017; SARAIVA

et al., 2017). Esse comportamento permite *Lu. longipalpis* obter uma vantagem competitiva em relação às demais espécies de flebotômíneos que transmitem LTA e que são sensíveis as variações sazonais, deixando de ocorrer em determinadas épocas do ano. Essa condição pode permitir a espécie *Lu. longipalpis* atuar como vetor secundário de LTA, pelo menos, sabe-se que ela é capaz de carrear *Leishmania* spp. Além disso, *Lu. longipalpis* também é um vetor oportunista e eclético, sem preferência para alimentação sanguínea, alimentando-se do sangue de vários tipos de animais como, cães, galinhas, roedores e também de sangue do homem (DIAS et al., 2003; TANURE et al., 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017).

No contexto da saúde pública, a LTA tem aumentado significativamente sua importância devido ao crescente processo de urbanização. Inicialmente, a doença tinha caráter eminentemente rural e, ao longo dos anos, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, com expansão geográfica no Brasil (DIAS et al., 2007). *Lu. whitmani*, um dos comprovados vetores do agente etiológico da LTA, tem também se adaptado a ambientes antropizado (TEODORO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; LEONARDO; REBÊLO, 2004; SILVA et al., 2010; VILELA et al., 2011; VIEIRA et al., 2015; SALES et al., 2015; PEREIRA FILHO et al., 2015). Essa condição pode ter inserido o agente etiológico de LTA em ambientes urbanizados onde *Lu. longipalpis* é a espécie dominante e se alimenta de sangue dos mesmos mamíferos reservatórios de diferentes espécies de *Leishmania*. Isso explica a detecção de DNA de parasitos de LTA em seu conteúdo estomacal (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017; FONTELES et al., 2018).

Em um estudo realizado na Colômbia central, em uma área com foco endêmico de LTA, foi registrada a ocorrência da espécie *Lu. longipalpis* sem nenhum caso de LVA ter sido notificado (LÓPEZ et al., 1996). Outro estudo, realizado em uma comunidade de Limón no Panamá, foi observada a ocorrência de *Lu. longipalpis* em área domiciliar endêmica para LTA. Limón é um ambiente que vem sofrendo o processo de urbanização ao longo dos anos, apresentando áreas degradadas pelo desmatamento. Essas observações mostram a capacidade deste vetor em frequentar ambientes modificados pelo homem (VALDERRAMA et al., 2011).

No Maranhão, localizado na região nordeste do Brasil, muitos trabalhos demonstraram a predominância de *Lu. longipalpis* nos peridomicílios rurais e urbanos (ARAÚJO et al., 2000; CARVALHO et al., 2000; DIAS et al., 2003; MARTIN; REBÊLO, 2006; GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2012 e 2017; PENHA et al., 2013; SILVA et al., 2010a, 2015a; PEREIRA FILHO et al., 2015). Muitos desses locais estão passando por um crescente processo de ocupação

desordenada, resultando em grandes aglomerados urbanos, às custas de profundas mudanças ambientais.

Em muitos municípios do Brasil que estão passando pelo processo de urbanização, onde há registro de casos de LTA, existe a suspeita do papel de *Lu. longipalpis* na transmissão dessa doença, porém na região da presente pesquisa não há dados de pesquisa de competência vetorial, para esta espécie de flebotomíneos, que comprovem essa relação. Assim, nos propomos a investigar se *Lu. longipalpis* é competente para transmitir *Le. amazonensis*, agente etiológico da LTA, para melhor compreender as complexas interações entre vetores, hospedeiros e parasitos, que irão subsidiar a aplicação de medidas de prevenção e tratamento adequado das leishmanioses, como também os métodos de controle dos vetores.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Investigar aspectos biológicos, comportamentais e moleculares em condições experimentais que auxiliem no estudo da capacidade e competência vetorial de *Lu. longipalpis* para LTA.

3.2 Específicos

- Estudar o ciclo de vida de *Lu. longipalpis* sob condições de laboratório e caracterizar os estágios evolutivos, incluindo ovo, larvas, pupa e adulto;
- Definir experimentalmente a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* para infectar-se com *Le. amazonensis*, agente causador da LTA;
- Detectar a taxa de proporção de alimentação sanguínea, mortalidade e infecção experimental por *Le. amazonensis*;
- Analisar experimentalmente a competência vetorial de *Lu. longipalpis* para transmitir *Le. amazonensis* para roedor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS DE CAMPO

4.1.1 Área de captura dos flebotomíneos

A captura de espécimes dos flebotomíneos foi realizada na Vila Bom Viver (02°21' a 02°12'S e 44°00' a 44°12' W), localizada no Município de Raposa, ilha de São Luís, em uma área provida de todas as infraestruturas e serviços urbanos, porém, arborizada, geralmente árvores frutíferas e próxima de capoeira (SILVA, 2008). Este Município está localizado ao norte do Estado do Maranhão na Mesorregião da Aglomeração Urbana de São Luís, capital do estado do Maranhão. (Figura 7). Abrange uma área de 75 km², limitando-se ao norte e oeste com o Oceano Atlântico, ao sul e leste com o Município de Paço do Lumiar, e distante cerca de 30 km do centro de São Luís. A população estimada do município é de 30.337 habitantes e a principal atividade local é a pesca e a manufatura do artesanato de palha (IBGE, 2018).

O clima é quente e úmido, com temperatura média anual em torno de 28°C. Apresenta duas estações bem definidas, uma de estiagem de julho a novembro, e outra chuvosa de dezembro a junho (IBGE, 2018). A estação chuvosa concentra, em média, 94% do total anual das chuvas, apresentando índices pluviométricos mais elevados nos meses de abril a junho. Durante a estiagem, a deficiência hídrica se faz sentir principalmente nos meses de outubro a novembro. A precipitação pluviométrica anual é de 1.900mm. A altitude média é de 5m nas partes mais baixas e 15m nas dunas e próximo aos córregos e vales, mas grande parte de sua área está submersa em água salgada. O ponto mais alto corresponde ao morro da Ponta do Farol, que mede 45m de altitude, onde fica o Farol do Araçagi. A hidrografia do município é constituída principalmente por praias, lagos e pequenos rios, como o rio Pimenta. Destacam-se as praias do Araçagi, Raposa, Carimã, Curupu e Belizário, onde se localiza o terminal pesqueiro constituído por bocas de rios (DIAS et al., 2003).

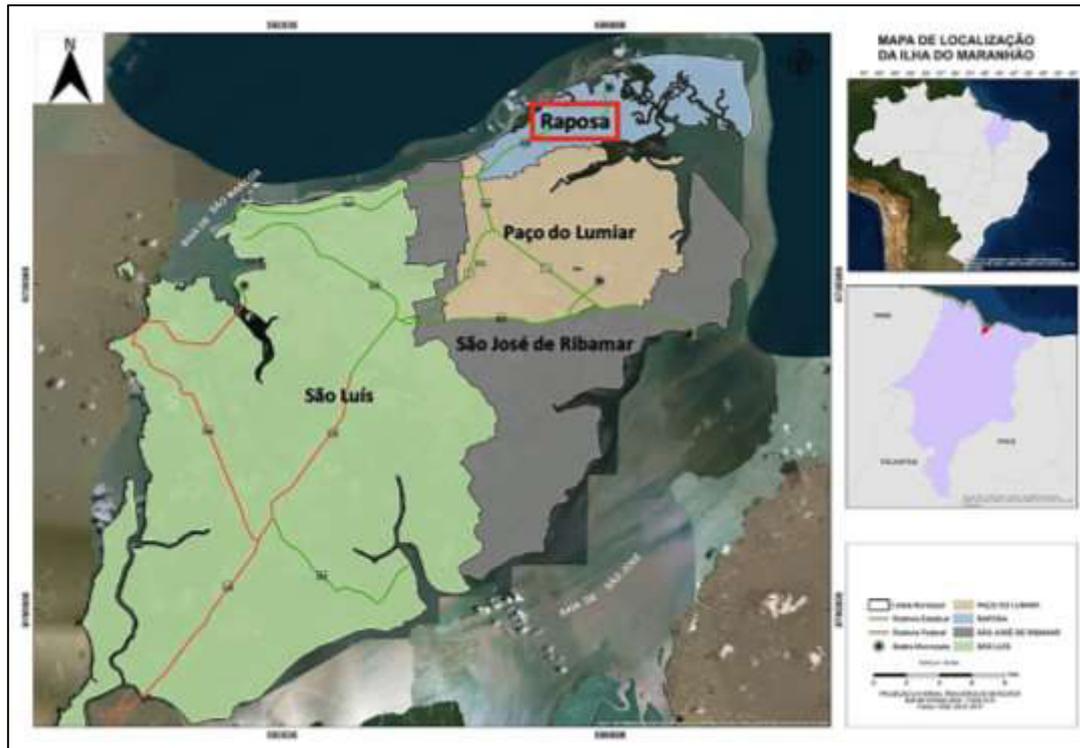


Figura 8. Localização do município de Raposa destacado de vermelho, na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Fonte: Batista, C. (2019).

4.1.2 Procedimento de captura dos flebotomíneos para o cultivo em laboratório

O grupo de estudo possui a Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico, emitida pelo Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO) sob o processo Nº 11965-2. Os estudos de campo foram realizados em terrenos privados e o proprietário autorizou a realização do estudo em sua área peridomiciliar. Além disso, os estudos de campo não envolveram espécies ameaçadas ou protegidas.

Para a captura dos flebotomíneos foram selecionados bairros periurbanos do município da Raposa, com infestação de *Lu. longipalpis*, com base nos inquéritos entomológicos e epidemiológicos cedidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão – LACEN.

Para facilitar a captura dos insetos, foram selecionadas somente residências com características favoráveis à proliferação de flebotomíneos, ou seja, aquelas com presença de vegetação (árvores frondosas) com acúmulo de matéria orgânica em decomposição no solo, como restos de vegetais e fezes de animais, priorizando os abrigos de animais domésticos, principalmente galinheiro presentes nos peridomicílio. Esses insetos foram capturados semanalmente em todos os meses do período de julho de 2017 a dezembro de 2019, por meio

de armadilhas luminosas tipo CDC (*Center of Disease Control*), alimentadas com pilhas alcalinas grande de 1,5 volts, instaladas nas residências por uma noite, das 18:00 às 6:00 horas do dia seguinte (Figura 8A). O intuito foi capturar o maior número de espécimes possível para manter a colônia estabelecida. Os locais de coleta (residências) dos flebotomíneos foram devidamente georreferenciados com auxílio de GPS (Sistema de Posicionamento Global) para registro da origem da colônia.

Posteriormente, as armadilhas com as gaiolas entomológicas de tecido de náilon com armações de metal (30 x 30 x 30 cm), contendo os insetos, foram transferidas para o Laboratório de Entomologia e Vetores – LEV/UFMA. Exemplares fêmeas e machos foram transferidos com o auxílio de aspirador de sucção bucal (modelo castro) (Figura 8B), para pequenos frascos transparente (potes de criação) de polietileno (5cm de diâmetro por 5cm de altura, capacidade 80 mL), contendo uma camada de gesso endurecida no fundo, mantida umedecida com água destilada para garantir a umidade no pote e fornecer uma superfície de repouso sem condensação de água. Esses potes foram vedados com um pedaço de tecido tipo náilon com um orifício central, onde o aspirador de sucção bucal poderia ser colocado para transferência de insetos adultos para gaiola (Figura 8C). Posteriormente, esses insetos adultos, capturados em campo, foram utilizados para o estabelecimento e manutenção da colônia.



Figura 9. (A) Armadilhas luminosas tipo CDC, instaladas em abrigos de animais domésticos. (B) aspirador de sucção bucal (modelo Castro) para manipulação de insetos adultos. (C) Potes de criação dos insetos acomodados em estufa do tipo BOD. Fonte: Autora.

4.2 Obtenção dos animais vertebrados

Para manter a colônia dos flebotomíneos em laboratório foram utilizados somente camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão - UFMA (Maranhão). Estes roedores foram utilizados para realizar o repasto sanguíneo dos insetos de origem do campo (P) e emergidos no laboratório (F). Como os flebotomíneos de campo poderiam ou não estar naturalmente infectados com *Leishmania* sp., foram utilizados camundongos somente para o repasto de fêmeas da geração P e outros somente para as gerações F.

Foi utilizado hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) somente para manutenção da cepa de *Le. amazonensis*. Com o objetivo de não perder a virulência da cepa, a cada seis meses os hamsters foram sacrificados, isolado a leishmânia e substituídos por novos animais.

Para os experimentos de infecção e transmissão experimental foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem Balb/c (*Mus musculus*) com cinco semanas de

idade, peso 25g (suscetíveis à infecção por *Leishmania*), provenientes do Biotério da Universidade de Campinas, São Paulo, local de excelência na produção de animais isogênicos para utilização experimental.

Todos animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular – LabGeM, UFMA, em caixas de policarbonato, recebendo ração comercial e água “*ad libidum*”, sob condições controladas de temperatura em torno de 21°C e alternados com ciclo claro-escuro de 12 horas, em sala adequada com janelas e portas teladas com malha fina.

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob os Protocolos nº 23115.006003/2017-11 e nº 23115.038067/2018-62 (Anexo B e C).

4.3 Obtenção e manutenção da cepa de *Leishmania amazonensis*

A cepa de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/1968/PH8) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant’Anna do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. A cepa foi mantida através de passagem em hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), onde formas amastigotas do parasito foram isoladas da lesão no membro (pata) infectado (Nº do protocolo da comissão de ética animal: 23115.038067/2018-62). A cultura das formas promastigotas do parasito foi mantida em meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA), suplementado com 1% de antibiótico (Penicilina 100µ/mL e estreptomicina 50µg/mL) e 20% de Soro Fetal Bovino – SFB (GIBCO) inativado a 56°C por 60 min. O cultivo foi feito em garrafas para cultivo celular estéril, em estufa modelo BOD a 27°C. Após a saídas dos parasitos dos macrófagos, formas promastigotas foram mantidas em cultura para posterior experimentos e também congeladas com 30% de glicerina em tubos criogênicos em freezer a -80 para estoque da cepa.

4.4 Infecção experimental dos camundongos via injeção de *Leishmania amazonensis*

Para os ensaios de infecção dos insetos com *Le. amazonensis* foram utilizados oito camundongos Balb/c infectados experimentalmente na membro posterior direita com 10^7 de promastigotas em fase estacionária, conforme citado por De Jesus Pereira et al. (2015) e Martins et al. (2015). No 41º dia após a infecção, os camundongos foram anestesiados (300 mg/kg de ketamina e 60 mg/kg de xilazina) e ofertados como fonte alimentar a flebótomos fêmeas emergidas na colônia de insetos (i.e., livres de infecção por *Leishmania*). Os animais foram

colocados em gaiolas revestidas de nylon e vidro, com armação de metal (30×30×30 cm), que foram acondicionadas em estufa BOD, no escuro, com temperatura de 27°C e umidade relativa de 80%.

4.5 Imunossupressão dos animais sadios

A imunossupressão dos camundongos sadios (i.e., sem infecção por *Leishmania* spp.) foi realizada somente para os ensaios de transmissão. Para isso foram utilizados quatro camundongos Balb/c sadios com aproximadamente 35 semanas de idade (adulto), pesando 28 g, os quais tiveram sua suscetibilidade à infecção aumentada ao receber dose única de ciclofosfamida (50 mg/kg/camundongo), via intraperitoneal, seguindo protocolo de Hafeez et al. (2001). Após 48h de aplicação da droga, os animais foram submetidos ao xenodiagnóstico após serem anestesiados (300 mg/kg de ketamina e 60 mg/kg de xilazina) e colocados em gaiolas revestidas de nylon e vidro, com armação de metal (30×30×30 cm), que foram inseridas em estufa BOD em condições de escuro, com temperatura de 27°C e umidade relativa de 80%.

4.6 EXPERIMENTOS DE LABORATÓRIO

4.6.1 Criação de *Lutzomyia longipalpis*

Para o estabelecimento e manutenção da colônia de *Lu. longipalpis* em laboratório, foram utilizados insetos machos e fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas, capturados no campo (Geração Parental = P). Foram estabelecidos dois grupos de fêmeas: 1) Individualizadas - as fêmeas foram colocadas individualmente em frascos de criação; 2) Agrupadas – as fêmeas foram colocadas em agregadas de 2 a 6 indivíduos, o que significa dizer que os imaturos (larvas e pupas) se desenvolveram juntas no mesmo frasco.

Exemplares desses insetos foram postos em pequenos potes de criação, e para garantir a umidade nos potes, estes foram acomodados em bandejas, contendo areia umedecida com água destilada, acondicionadas em estufa modelo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura controlada de 27°C e Umidade Relativa (UR) 80% (Figura 9A). As fêmeas provenientes de campo não ingurgitadas foram mantidas em gaiolas entomológicas para realizar o repasto sanguíneo por 60 min em camundongos Swiss (*Mus musculus*), devidamente anestesiado (Xilazina-20mg/kg e Ketamina-100mg/kg), sempre com a presença dos flebotomíneos machos, simulando o ambiente de agregação natural e para realização de cópula (Figura 9B). As fêmeas que não realizavam a alimentação após 60 minutos foram colocadas de volta nos potes de criação e no dia seguinte foram submetidas a alimentação no camundongo

novamente. Após a alimentação sanguínea, as fêmeas e machos foram transferidos para os potes, sendo ambos alimentados com mel diluído em água destilada, na proporção de 1:1. Essa solução açucarada foi embebida em chumaços de algodão e colocados diretamente sobre o tecido de náilon na parte superior dos potes, próximo ao orifício central, disponível “*ad libitum*”. Importante ressaltar que para facilitar a vontade dos insetos de realizar alimentação sanguínea esta dieta foi suspensa por 12 horas antes dos experimentos de capacidade e competência vetorial (item 4.6.3). Ambos os sexos foram mantidos nos potes de criação para o acasalamento e postura dos ovos (Figura 9C), para obtenção da primeira geração (F₁).

Após a ovipostura, à medida que as larvas eclodiam eram alimentadas com pequenas quantidades de ração (fezes de coelho e ração de peixe triturados, autoclavada antes de seu uso) até o último estágio larval (Figura 9D). Em todos os estágios larvais, os potes contendo as formas imaturas foram observados diariamente para controle de umidade, com adição de água destilada e controlados quanto à proliferação de fungos e presença de ácaros através da limpeza dos potes [adaptação da metodologia sugerida por Brazil e Brazil (2003)]. Quando formadas as primeiras pupas (Figura 9E), diminuía-se a oferta da ração para evitar proliferação de fungos e morte dos adultos recém emergidos. Cada pote de criação foi codificado conforme a geração do flebotomíneo criado no laboratório. A Figura 10 representa um esquema da metodologia de criação de *Lu. longipalpis* em condições de laboratório.



Figura 10. (A) Potes de criação acondicionadas em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), com temperatura e Umidade Relativa controlada; (B) Alimentação sanguínea dos flebotomíneos em camundongos Swiss (*Mus musculus*) anestesiado; (C) Postura de ovos para obtenção dos insetos adultos nascidos em laboratório; (D) formas imaturas no estágio larval; (E) formas imaturas no estágio de pupa.

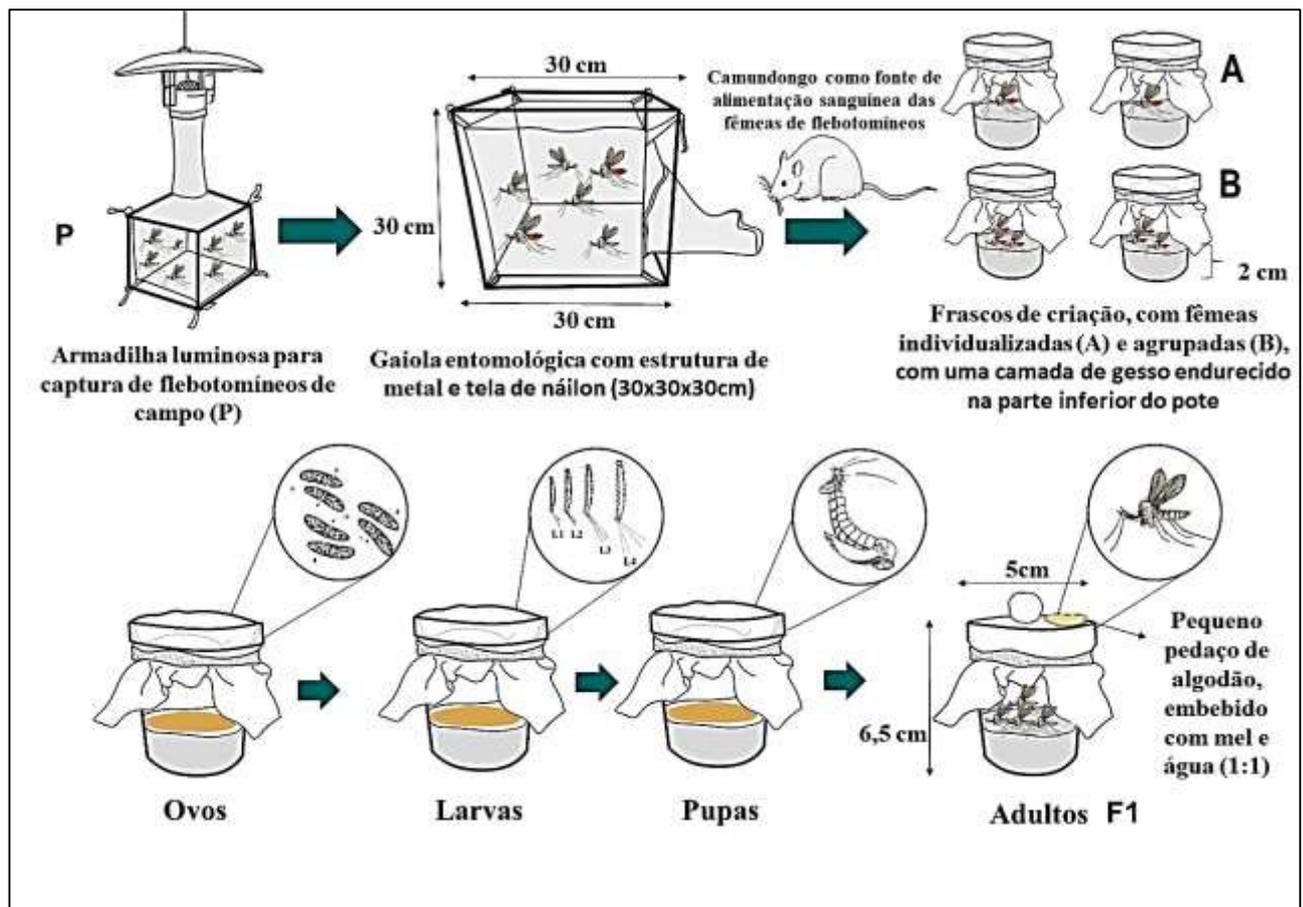


Figura 11. Ilustração da manutenção de flebotomíneos em laboratório, desde a captura dos insetos adultos no campo (P) até o nascimento das primeiras gerações (F1). Fonte: Autora.

4.6.2 Identificação das fêmeas de flebotomíneos capturadas do campo

As fêmeas ingurgitadas de campo (individualizadas e agrupadas), mantidas na estufa, foram observadas diariamente para a verificação da postura de ovos. Após a ovipostura e morte foram dissecadas (cabeça e os dois últimos segmentos abdominais), diafanizadas e montadas entre lâmina e lamínula em lactofenol (diluído em fenol cristalizado, ácido láctico, glicerina e água destilada). O propósito foi observar os caracteres morfológicos do cibário e das espermatecas, respectivamente. A identificação dos espécimes para confirmação da espécie *Lu. longipalpis* foi realizada com auxílio de chave taxonômica proposta por Galati (2003). A identificação dos espécimes de campo foi essencial para não haver criação de outra espécie de flebotomíneo coletado, que não era *Lu. longipalpis*.

4.6.3 Ensaios de infecção e transmissão experimental

Primeiramente foram realizados os experimentos de infecção (denominado ExpA), que se referem à infecção de *Lu. longipalpis* por *Le. amazonensis* por meio da picada dos insetos à camundongos experimentalmente infectados (1º repasto sanguíneo). Os ensaios foram realizados de acordo com o número de fêmeas disponíveis emergidas na colônia de insetos (descrito no item 4.6.1), totalizando 485 fêmeas com três a quatro dias de vida, provenientes das gerações F1, F2 e F3. Oito camundongos Balb/c infectados (descrito no item 4.4) foram colocados dentro de gaiola para servirem de fonte de alimento aos flebotomíneos, de modo que dois animais foram expostos para o mesmo grupo de flebotomíneos, de forma sequencial, durante 60 minutos cada. Assim, cada grupo de insetos (de 27 a 65 fêmeas/animal) teve um total de 120 minutos disponíveis para se alimentar. Foi realizado um total de 12 tentativas de repasto sanguíneo (grupos I a XII). A Figura 11A mostra o esquema da infecção experimental dos insetos.

O experimento de transmissão (denominado ExpB) se refere à transmissão de *Le. amazonensis* para camundongo sadio por meio de picada de *Lu. longipalpis* proveniente do ExpA, durante o segundo repasto sanguíneo do inseto (Figura 11B). O ExpB foi realizado após 5 a 10 dias do ExpA, pelo oferecimento de animal imunossuprimido e livre de infecção (descrito no item 4.5) como fonte alimentar aos insetos durante 60 minutos (Figura 11B). Foram seguidas as mesmas condições para permitir a alimentação dos insetos nos animais, como descrito para os ensaios de infecção dos insetos. Quatro animais foram utilizados durante 12 tentativas de segundo repasto, dos quais apenas dois (Animal A e Animal B) sobreviveram após o início dos ensaios até serem eutanizados. Os outros dois animais morreram de morte desconhecida, três

dias após à picada de flebotomíneos infectados. Todas as fêmeas ingurgitadas foram investigadas quanto a presença do parasito, por meio de dissecação do intestino conforme descrito no item 4.6.5 e detecção de DNA de *Leishmania* (item 4.6.6). O anexo A2, na Tabela 1 mostra todos os grupos usados em cada experimento (ExpA e ExpB) e as taxas de fêmeas ingurgitadas, taxas de infecção experimental e o resultado dos animais (ExpB) após serem segunda fonte de alimentação sanguínea para os insetos oriundos do Exp A.

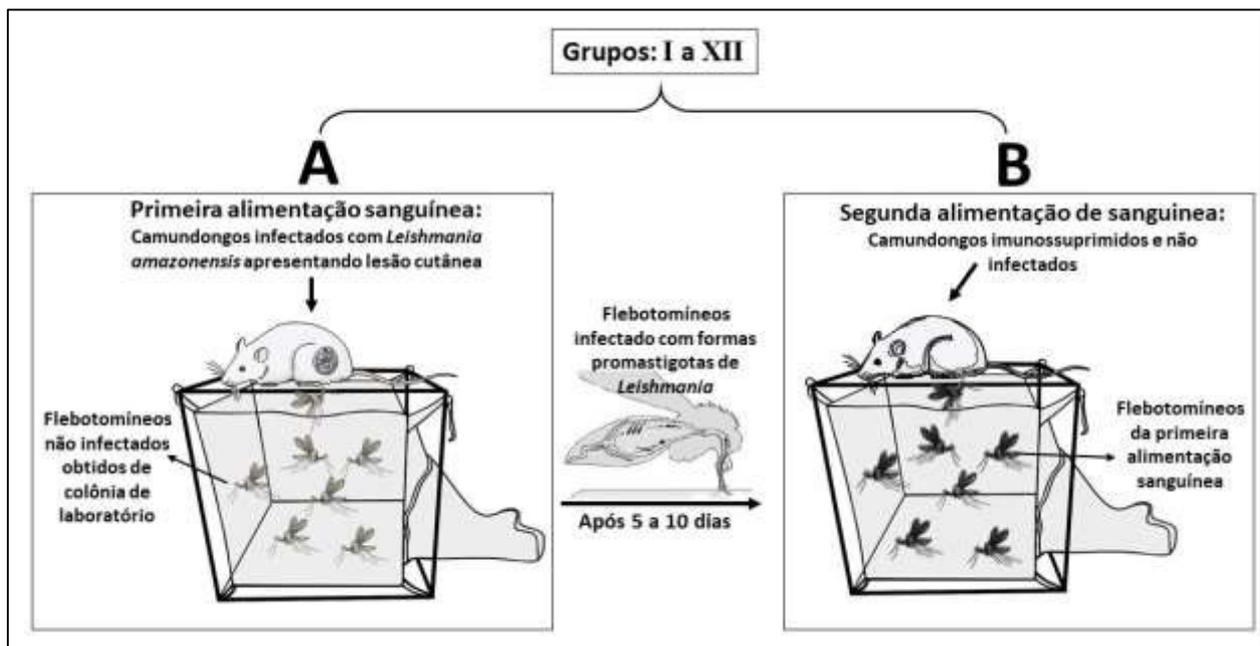


Figura 12. Desenho experimental da infecção de *Lu. longipalpis* por meio de repasto sanguíneo em animais infectados com *Le. amazonensis* (A); Transmissão de *Le. amazonensis* para camundongo imunossuprimido, via picada de *Lu. longipalpis* previamente alimentados em camundongos experimentalmente infectados (B).

4.6.4 Acompanhamento após os ensaios de transmissão

Para avaliar se houve a transmissão de *Le. amazonensis* via picada de *Lu. longipalpis*, os camundongos, utilizados nesse ensaio, foram examinados semanalmente, quanto ao seu estado físico geral (queda de pelos e alterações no estado da pele) e quanto ao aparecimento de lesões na pele. Quando foram encontrados sinais clínicos sugestivos de infecção, o camundongo foi eutanasiado por overdose de anestésico (60 mg / kg de xilazina e 300 mg / kg de ketamina) e uma necropsia foi realizada para obtenção do baço, fígado, linfonodos e de tecidos dérmicos das lesões na pata e no focinho.

4.6.5 Dissecção de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitadas

Foram dissecadas todas as fêmeas que realizaram o segundo repasto sanguíneo com o objetivo de registrar a presença ou ausência de promastigotas de *Le. amazonensis* no intestino dos flebotomíneos. Para isso, as fêmeas foram quantificadas e anestesiadas por 5 minutos a -20°C e dissecadas, individualmente, em gotas de solução salina (NaCl) a 0.9%, expondo o intestino para observação da presença de formas promastigotas sob microscópio óptico.

4.6.6 Ensaios moleculares

Todos os insetos ingurgitados (N = 291) e amostras do camundongo utilizado no ensaio de transmissão (lesão da pata, baço, fígado e linfonodo inguinal), tiveram seu DNA extraído pelo método Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), de acordo com Michalsky et al. (2002).

A detecção do DNA de *Leishmania* foi realizado pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR) por meio da amplificação de um fragmento de 300 a 350 pares de bases (pb) do gene fragmento *ITS1*, utilizando os *primers* LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), segundo Schoënian et al. (2003). A reação da PCR (26µL) foi preparada contendo a concentração final de 1µM de cada *primer*; dNTP 0.2mM (Promega®), 1U de Taq DNA Polimerase (Promega®), 3mM de MgCl₂, tampão da enzima e 3µL de DNA. A amplificação foi realizada em Termociclador *Personal Cycler* (Biometra™) de acordo com Schoënian et al. (2003). Para cada ensaio foi utilizado um controle negativo (mistura de reação + 3µL de água estéril) e um controle positivo (mistura de reação + 3µL de DNA de *L. amazonensis* [IFLA/BR/1968/PH8], extraído de culturas). Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e seus tamanhos comparados com um marcador de tamanho de DNA de 100 a 1000 pares de base (pb).

As amostras positivas foram purificadas com o kit comercial ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoScientific™) e enviados para o serviço de sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. As sequências foram depositadas na plataforma GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnological Information*).

4.6.7 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária das amostras (baço, fígado, linfonodo inguinal e lesão da pata), foi determinada pelo método de diluição limitante. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas individualmente em 1.0 ml de meio Schneider, suplementado com 20% de

soro fetal bovino inativado. A suspensão de células do homogeneizado das amostras foram diluídas em 1:2 no primeiro poço, que continha 100 µl do meio, perfazendo um volume total de 200 µl de suspensão. Do primeiro poço, 100 µl da suspensão foram retirados e a diluição 1: 2 continuou até o 12º poço da placa de 96 poços. Este ensaio foi realizado em duplicata e incubados a 27° C, e após 24h, 48h e 72h, as amostras de cada poço foram analisadas e definida como positiva ou negativa, dependendo da presença ou ausência de promastigotas em cada poço (CASTELO-BRANCO et al., 2019). O número total de parasitos / amostra foi calculado como descrito por Rodrigues et al. (2009).

4.6.8 Análise Histopatológica

Fragmentos de baço, fígado e lesão cutânea na pata esquerda foram coletadas, fixadas em formaldeído a 10% por 24 horas e posteriormente processadas para inclusão em parafina pura. Posteriormente, cortes de 5µm foram realizados e as lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina e Giemsa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). As amostras foram observadas em microscópio óptico de luz.

4.6.9 Análise imunohistoquímica

A análise imunoistoquímica foi realizada para identificar formas amastigotas na pele (lesão no membro anterior direito), baço e fígado. A metodologia foi realizada de acordo com a descrição de Tafuri et al. (2004). Resumidamente, soro de um cão naturalmente infectado por *Le. amazonensis* foi usado como anticorpo primário e um polímero anti-camundongo de cabra foi usado como anticorpo secundário. O ensaio de imunohistoquímica foi corado com 3 3'-diaminobenzidina e as amostras de tecido foram contrastadas com hematoxilina de Harris. A análise imunoistoquímica foi considerada positiva quando as amastigotas, coradas em marrom, foram visualizadas. Assim, as amostras foram pontuadas como positivas ou negativas. Como controle imunohistoquímico, utilizamos amostra de baço de camundongo não infectado e realizamos todas as etapas da imunohistoquímica e também omitimos o anticorpo primário e realizamos a técnica em uma amostra com amastigotas identificados pela histologia.

4.6.10 Estudo da Proporção de Alimentação Sanguínea (PAS) e Mortalidade (PM) dos flebotomíneos

Para avaliar a Proporção de Alimentação Sanguínea (PAS) dos flebotomíneos que realizaram a alimentação sanguínea no camundongo infectado e no camundongo sadio, em cada

grupo calculamos o número de fêmeas ingurgitadas em relação ao número total de fêmeas (ingurgitadas e não ingurgitadas). A Proporção de Mortalidade (PM) foi calculada pelo número de fêmeas ingurgitadas mortas após o primeiro repasto sanguíneo (TFM) em relação ao número total de fêmeas ingurgitadas (FI), mortas e sobreviventes (DINIZ et al., 2014).

4.6.11 Taxa de infecção experimental dos insetos

A taxa de infecção experimental foi determinada pelo número de fêmeas positivas que realizaram a alimentação sanguínea em camundongo infectado com *Leishmania*, (de acordo com o método de PCR), em relação ao total das fêmeas ingurgitadas positivas e negativas (PAIVA et al., 2006).

4.7 ANÁLISE DE DADOS

A taxa de fecundidade dos insetos foi calculada pela relação entre o número total de ovos e o total de fêmeas ingurgitadas; e a taxa de produtividade foi calculada pela relação entre o total de adultos nascidos pelo total de ovos produzidos. A taxa de mortalidade dos estágios imaturos (ovo, larva e pupa) foi calculada pelo número de imaturos mortos dividido pelo total de imaturos em cada frasco multiplicado por 100.

Avaliou-se a média do número de ovos por fêmea, duração em dias do desenvolvimento de cada estágio imaturo e duração do ciclo de vida somente nos tratamentos em que as fêmeas foram individualizadas. Para comparação das taxas de fecundidade e produtividade entre os grupos (IF = fêmeas individualizadas ou GF = fêmeas agrupadas) e comparação da proporção sexual, utilizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk e como os dados não se ajustaram à distribuição normal utilizou-se o teste de Mann-Whitney (U) não pareado ($\alpha = 0.05$). Essas análises foram realizadas por meio do pacote estatístico GraphPad Prism v. 5.00.28TM (Califórnia, EUA).

Nos ensaios de alimentação sanguínea dos insetos, as diferenças entre as proporções da primeira e segunda alimentação foram analisadas por meio de um teste Mann-Whitney não paramétrico. Um valor de p de 0,05 ou menos foi considerado significativo. As médias e desvio padrão das análises de PAS e PM, e o teste mencionado acima foram aplicados por meio do pacote estatístico BioEstat 5.0 (Belém, Pará).

Para a confirmação da sequência de DNA de *Le. amazonensis* resultante após o sequenciamento, utilizamos a ferramenta de alinhamento online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível pelo NCBI (BORATYN et al., 2013). A sequência obtida

do nosso trabalho foi alinhada com sequências do marcador *ITS-1* de *Leishmania* spp. obtidas em outros trabalhos (Tabela Suplementar 2) com auxílio da ferramenta Clustal W (THOMPSON et al., 1994) do software BioEditv7.2.5 (HALL, 1999). Após alinhadas, reconstruímos a filogenia das sequências pelo método de *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987); a árvore ótima foi selecionada a partir de 1000 réplicas de agrupamento feitas pelo teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) e as distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de Kimura 2-parâmetro (KIMURA, 1980). As análises para reconstrução da filogenia foram feitas no software MEGA-10 (KUMAR et al., 2018).

4.8 CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Em relação ao estabelecimento da colônia de flebotomíneos, estes foram mantidos em local adequado e protegido contra a fuga, que é o insetário (sala de criação de insetos) localizado no LEV. O insetário foi dividido em duas salas: **i)** sala do criatório, onde a colônia foi mantida no interior de duas estufas verticais tipo BOD. Para a biossegurança esta sala foi mantida fechada e isolada com permissão de entrada apenas para os pesquisadores responsáveis. As três janelas desta sala foram devidamente protegidas, com tela ultrafina que impedia a passagem de insetos das dimensões dos flebotomíneos (3 mm); a única porta foi emborrachada para prevenir fuga dos insetos; **ii)** sala de manipulação, ante-sala necessária para triagem dos insetos, preparação de material da colônia, contendo as mesmas adaptações do criatório. Em caso de fuga dos insetos, estes foram recapturados com aspirador de sucção bucal e armadilhas luminosas instaladas no interior da sala (Anexo D).

Os camundongos foram mantidos em segurança no Biotério de Experimentação Animal do LabGeM. Estes animais foram isolados em caixas próprias, protegidas com tela, contra picada de qualquer inseto, com alimento e água "*ad libitum*". Durante os experimentos de infecção e transmissão, os camundongos foram transportados para o LEV dentro de suas gaiolas, protegida com tela de nylon fina, dentro de uma caixa de papelão. Após o término do repasto sanguíneo dos insetos, os camundongos foram transportados de volta para o LabGeM e mantidos em segurança no Biotério. Ao final dos experimentos, os camundongos foram eutanasiados por overdose de anestésico (xilazina - 60 mg/kg e Ketamina - 300 mg/kg), seguido de deslocamento cervical e o descarte dos animais foi feito segundo as normas de biossegurança preconizadas pela UFMA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CAPITULO 1:

Artigo 1 – Publicado no periódico *Journal of Medical Entomology*

Journal of Medical Entomology, XX(X), 2021, 1–9
doi: 10.1093/jme/tjab053
Research



Vector/Pathogen/Host Interaction, Transmission

Maintenance and Productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Colony from an Area Endemic for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Brazil

Rosa Cristina Ribeiro da Silva,^{1,2,3,5,6} Léo Nava Piorsky Dominici Cruz,^{1,4,6}
João Manoel da Silva Coutinho,^{1,2} Nürzia Cristina Correia Santana,¹ and
José Manuel Macário Rebêlo^{1,2}

¹Laboratory of Entomology and Vectors, Department of Biologia, Universidade Federal do Maranhão - UFMA, Cidade Universitária do Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFMA, Department of Ciências Fisiológicas, São Luís, Maranhão, Brazil, ³Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Department of Biologia (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil, ⁴Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Department of Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, Brazil, and ⁶Corresponding author, e-mail: rosinhachris@gmail.com

Subject Editor: Richard Johnson

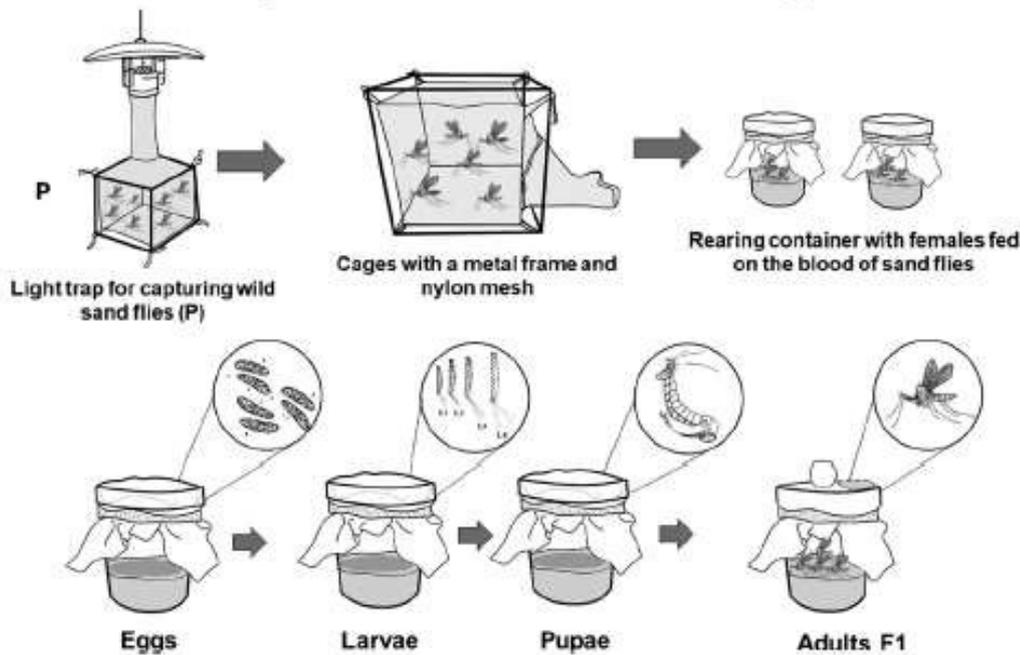
Received 4 December 2020; Editorial decision 3 March 2021

Abstract

Studies on experimental sand fly infection require the availability of colonies and laboratory conditions. In Brazil, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) (Lutz and Neiva 1912) is responsible for the highest infection rates by *Leishmania* spp. and this species is one of the most suitable species for laboratory colonization. In this study, we describe a method for growing *Lu. longipalpis* in laboratory conditions (10 generations) from natural populations sampled from a region of high endemicity for visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Northeastern Brazil. Using two methods (individualized or grouped females), the colony's highest productivity occurred in the first four generations, where all stages presented with high frequency. Nonviable eggs represented more than 50% of the total eggs produced by engorged females, while pupae were more resistant to fungal contamination, with a mortality rate of only 2%. In both methods, there was a predominance of female emergence; however, the ratio between males and females did not show significant differences, IF ($P = 0.8023$) and GF ($P = 0.1831$). Using the method of individualized females, the F4 generation took the longest to appear (234 d; 64 ± 57 d); by grouped females, F3 took the longest to appear (102 d; 47 ± 20 d). This method provides sufficient numbers of insects to perform vector competence tests for *Leishmania* spp. that cause the cutaneous form of leishmaniasis, usually found in *Lu. longipalpis* sampled from the study location.

Graphical Abstract

Mass rearing of the sand flies under laboratory conditions



Key words: phlebotomine, experimental colony, rearing method, biological vector

The sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) is the primary vector of *Leishmania (Leishmania) infantum* (Cunha and Chagas 1937) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Cunha and Chagas 1937), the etiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL) in the new world (Arrivillaga and Feliciangeli 2001, Lainson and Rangel 2005). The insect's distribution is wide in the Americas, extending from Mexico to Uruguay (Young and Duncan 1994, Salomón et al. 2011).

Several studies highlighted the adaptability of *Lm. longipalpis* to anthropic environments in Brazil (Deane and Deane 1957, De Souza et al. 1981, Resende et al. 2006, Dias et al. 2007). This adaptability was evidenced by considerable infestation inside houses and in peridomestic and the parasites' ability to feed on several domestic and synanthropic animals (Dias et al. 2003). This process is accompanied by an increase in visceral and cutaneous leishmaniasis (VL and CL, respectively) in rural and suburban areas of South America (Deane and Deane 1957, Forattini 1973, Rebêlo et al. 1999a,b; Rangel and Lainson 2003; Gontijo and Melo 2004; Barata et al. 2005; Conceição-Silva and Alves 2014; Vianna et al. 2016; Guimarães-e-Silva et al. 2017; Pereira-Filho et al. 2018; Fonteles et al. 2018).

In Maranhão, *Lm. longipalpis* have been found in considerable density in rural areas, urban areas of small cities (100–300 thousand inhabitants), and in the suburbs of large cities (1 million inhabitants), where active AVL and American cutaneous leishmaniasis (ACL) transmission occurs. In these areas, populations of *Lm. longipalpis* have been identified with DNA from several species of *Leishmania* spp. that cause both forms of leishmaniasis (Guimarães-e-Silva et al. 2017, Pereira-Filho et al. 2018, Fonteles et al. 2018).

These findings raise the index of suspicion for the possible participation of *Lm. longipalpis* in the epidemiological cycles of ACL, because in the previous 3 yr (2016–2019), 3,244 cases of this disease were registered in Maranhão, corresponding to 29.4% of the 11,051 reported cases in the Brazilian Northeast (SVS/MS 2019).

The establishment of colonies of *Lm. longipalpis* is essential to demonstrate the transmission of other *Leishmania* spp. because this vector is one of the most suitable sand fly species for colonization in laboratories. The vector insect's maintenance in the laboratory allows studies of reproductive biology, morphological variation, behavior, development of insecticides, and the capacity and vector competence; such studies improve understanding of parasite–vector–host interactions (Killick-Kendrick et al. 1977, Killick-Kendrick 1978).

Several works described basic methods of experimental rearing for sand flies (Killick-Kendrick 1977, Modi and Tesh 1983, Rangel et al. 1986, Lawyer et al., 2017). Despite these insects being reared in the laboratory under controlled temperature and humidity conditions, we know that specific microclimates in given locations characterize different geographic regions. There is a need for adjustments to achieve successful maintenance of colonies in various regions in this context.

Therefore, in this study, we describe the process of establishing and maintaining a laboratory colony of *Lm. longipalpis* acquired from natural populations in the state of Maranhão. The idea is to present a volume of data from the region and the colony's performance established from 2017 to 2019. Considering that many specimens were produced in a future follow-up study, we will present the results of a study of their vectorial competence for parasites that cause ACL under laboratory conditions.

Methodology

Sampling of Sand Flies

Wild specimens of *Lu. longipalpis* were captured in Raposa, located in northern Maranhão in the Mesoregion of the Urban Agglomeration of São Luís. This region covers 75 km², delimited to the north and west by the Atlantic Ocean, and the south and east by the Municipality of Paço do Lumiar, located 30 km from São Luís. The region has an estimated population of 30,337, and the primary local occupations are fishing and the manufacture of straw crafts (IBGE 2018; Supp Fig. S1 [online only]). The place of capture of the sand flies was Vila Bom Viver (02°21' to 02°12'S and 44°00' to 44°12'W), located in an old secondary forest area, with most of the streets paved, houses built of masonry and wooded yards, usually with fruit trees (Silva et al. 2008).

The region's climate is hot and humid, with an average annual temperature of around 28°C. There are two well-defined seasons, a dry season from July to November and a rainy season from December to June (IBGE 2018). The rainy season contributes 94% of the annual total of rains, with higher rainfall levels from April to June. During drought, water deficiency is felt primarily from October to November. The annual rainfall is 1,900 mm. The average altitude is 5 m in the lower parts and 15 m in the dunes and close to streams and valleys; however, a large part of its area is submerged in saltwater. The highest point corresponds to the Ponta do Farol hill, 45 m high, where the Farol do Araçagi is located. The municipality's hydrography originates primarily from small rivers and estuaries. In particular, we highlight the beaches of Araçagi, Raposa, Carimã, Curupu, and Belizário, where fishing terminals are located at rivers' mouths (Dias et al. 2003).

We collected samples weekly every month from July 2017 to December 2019, using Centers for Disease Control light traps, coupled to nylon fabric entomological cages, with 30 × 30-cm metallic frames (Supp Fig. 2aS [online only]). Four traps were installed from 6 p.m. to 6 a.m. the following day, in chicken coops located in the peridomicile of a residence (2°26'28.72"S; 44° 6'6.53"W).

Vertebrate Animals and Ethical Considerations

We kept male Swiss mice (*Mus musculus*) to maintain the colony in the experimental bioterium at the Genetics and Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil. To ensure the specimens of sand flies born in the laboratory were free of infection by *Leishmania* spp., the mice exposed to the field insects were not the same as those fed the insects born in the laboratory. The mice were kept in polycarbonate boxes under controlled temperature conditions, around 21°C, with 12-h light-dark cycles, and water and food provided ad libitum.

The animals' breeding was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA) of UFMA, Maranhão, São Luís (MA), Brazil, under Protocol n° 23115.006003/2017-11. Regarding the capture of sand flies, our study group has a Permanent License for the Collection of Zoological Material, issued by the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) under process no 11965-2. Field studies (in urban areas) did not involve threatened or protected species.

Laboratory Maintenance Method

The colonization methods used during the first 10 generations followed the protocols reviewed by Lawyer et al. (2017) as follows.

The adult insects, male and female, captured in the field (parental generation = P) were transported in entomological cages to

the Laboratory of Entomology and Vectors of the Federal University of Maranhão (UFMA), located approximately 30 km from the sampling site. We incubated the entomological cages in biochemical oxygen demand chambers for females' blood feeding, with a monitored temperature of 27°C and relative humidity of 80%. The female insects were fed for 60 min on the anesthetized Swiss mice (ketamine 300 mg/kg and xylazine 60 mg/kg), always in the presence of males, simulating the natural environment conditions of lekking and copulation (Fig. 1). Females that did not feed after 60 min were replaced in the breeding pots. The following day, they were fed on the mice again. The biochemical oxygen demand greenhouse had no photoperiod control; that is, the immature and adult insects were kept in the dark conditions for 24 h.

To observe better performance in egg productivity, the females from the field, after blood feeding, were transferred together with the males to rearing containers using a mouth suction aspirator (Castro model), made of a 30-cm acrylic tube with a straight tip, a rubber hose, an individual cigarette holder, and a super-thin nylon mesh to avoid aspirating sand flies into the investigator's mouth. The containers were small and made of transparent polyethylene (5 cm in diameter by 6.5 cm in height, capacity of 100 ml), with a hole in the bottom (1 cm) and a layer of hardened plaster covering the inner bottom (2 cm thick).

We established two groups of females: 1) Individualized females (IF) placed in rearing containers. This method has a low oviposition rate and, consequently, a low number of adults obtained. However, we can study the biology of the number of eggs per female, duration of the life cycle, and each stage of immature; 2) Grouped females (GF) (two to six organisms) were placed in aggregates, meaning that immature organisms (larvae and pupae) developed together in the same container. This method was the most used because, in these grouping conditions, the oviposition rate is high, and, consequently,

we obtain a greater number of adults per week. The rearing containers were accommodated in polyethylene trays (28 × 42 × 7.5 cm) containing autoclaved sand moistened with distilled water to ensure permanent humidity. Then, we covered the containers with nylon mesh (tied with elastic bands at the edge), with a central hole (1.2 cm in diameter). We introduced or removed the adult sand flies in the cage using the mouth suction aspirator through that hole. To prevent insects from escaping, we plugged the screen hole with cotton wads.

All adult insects P (insects collected in the field) and F (generations born in the laboratory) were kept in entomological cages only during blood feeding. In this way, mating was also carried out in the rearing container. This method was carried out to preserve more space in the biochemical oxygen demand chambers, allowing the allocation of several rearing containers, thereby generating greater numbers of insects.

After egg laying, we removed the dead females present in the container using entomological forceps. Only adults captured from the field removed from the pots after laying eggs were identified. The identification occurred using the morphology of the spermathecae, according to Galati (2003). The eggs were placed on the wet surface of the plaster; in the case of eggs laid on the lateral of the container, they were transferred to the plaster surface using a thin brush (Supp Fig. 2cS [online only]). The development of eggs, larvae, and pupae (immature stages) occurred within the same container.

As the larvae hatched, we fed them small amounts of food—dried rabbit feces mixed with fish feed, both crushed, sterilized, and stored in a freezer (Brazil and Brazil 2003)—until the last larval stadium. All containers with immature stages were checked once a day for humidity control (with the addition of distilled water in the tray

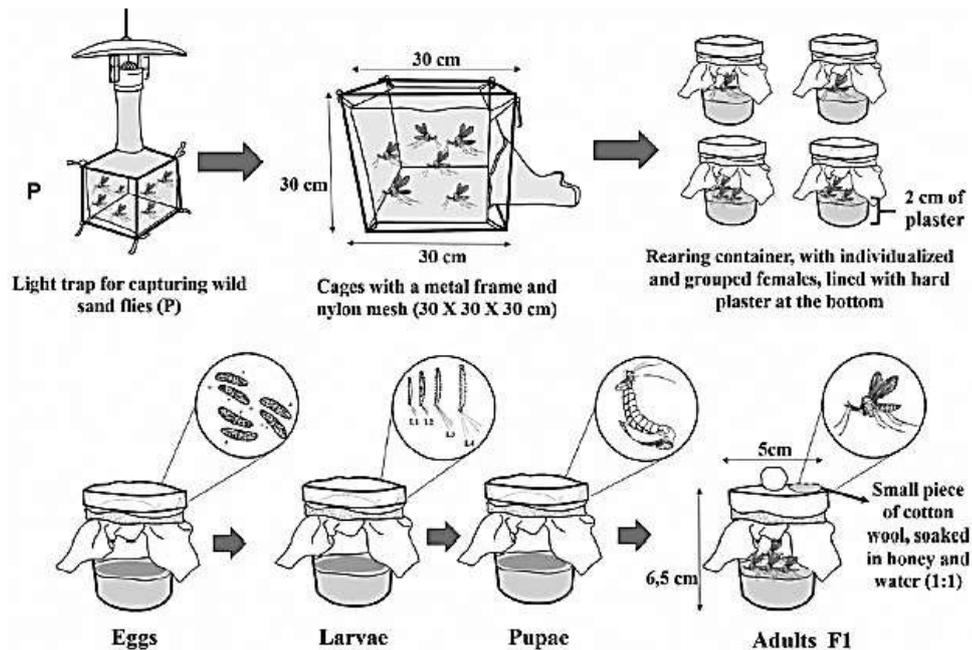


Fig. 1. Establishment and maintenance of a colony of *Lu. longipalpis* grown under laboratory conditions starting from the capture of wild sand flies (P) until generations of laboratory (F1).

containing sand) and for the avoidance of the proliferation of fungi and the presence of mites.

By the time the first pupae appeared, we suspended the feed supply inside the containers to prevent the proliferation of fungi and the death of the newly emerging adult sand flies. At this stage, we placed small pieces of cotton wads soaked with honey diluted in distilled water (1:1) directly on the nylon screen, providing a source of nourishment for the newly emerged adults.

Both males and females were kept in rearing containers for mating, laying eggs, and obtaining healthy insects born in the laboratory (F generations). Subsequently, the immature and adult stages of containers containing both individualized females and grouped females were quantified. After all the adults emerged, the rearing containers were washed, sterilized, and reused.

Data Analysis

For all analyses (except for sex ratio), we considered generation P as all insects collected in the field and the immature stages (egg, larva, and pupa) produced by the field females. The adults that emerged from P were the insects of generation F1 (as well as their immature offspring); the adult forms of F1's offspring were considered F2, and so on. The fecundity rate was calculated by dividing the total number of eggs by the total number of engorged females; the productivity rate was calculated by dividing the total number of adults born by the number of eggs laid (Luitgards-Moura et al. 2000). The mortality rate of the immature stages (egg, larva, and pupa) was calculated by dividing the number of dead immature individuals by the total number of immature individuals for each container.

In containers with individualized females, we calculated the average number of eggs per female, period (in days) of development of each immature stage and period of the life cycle. To compare fecundity and productivity rates between groups (IF = individualized

females or GF = grouped females) and sex ratios, we used the Mann-Whitney *U* test (*U* unpaired ($\alpha = 0.05$)). The database was created using Microsoft Excel 2016 software, and data analysis was performed using GraphPad Prism v. 5.00.28 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

The laboratory colony of *Lu. longipalpis* produced 10 consecutive generations (F1–F10), starting from the parental generation (Table 1). The total numbers of engorged females used to establish the colony differed between the IF (525 females) and GF (1961 females) groups. The performance in egg production was also different between groups: we obtained an average number of total eggs produced for the GF group (35.7) higher than that of the IF group (31.4) (Table 1), with a significant difference ($U = 103,000$; $P = 0.0001$; Fig. 2A). However, the IF group surpassed GF in the production rates of larvae (48.4×32.8) and pupae (77.7×75.6), meaning a greater loss of these stages in containers with multiple adults. The rate of emergence of adults from pupae was similar between groups. However, considering the adult emergence rate (Table 1), at the end of development, we found that the IF group performed better, with a rate of 36.8% of eggs (16,516) that resulted in adult individuals, while the group GF presented 24.4% of eggs (69,934) that resulted in adult individuals, with a significant difference ($U = 112,300$; $P = 0.0191$, Fig. 2B).

We also observed higher productivity of the colony during the first four generations (considering the two methods), where all stages had a high frequency. Hence, there was a gradual decrease in productivity (along with a decrease in the numbers of engorged females) until the worst performance in the last four generations occurs. The IF had the highest number of emerged adults in the parental

Table 1. Number of *Lu. longipalpis* individuals produced in laboratory conditions, for 10 generations, according to the methods used and evolutionary stage

Generations	IF—individualized females					GF—grouped females				
	Females ^a	Eggs	Larvae	Pupae	Adults	Females ^b	Eggs	Larvae	Pupae	Adults
Parental	152	4,272	2,021	1,599	1,572	312 (73)	10,586	3,742	3,207	3,193
F1	95	2,699	1,120	878	837	456 (98)	15,449	5,060	4,152	4,104
F2	97	3,149	1,473	1,249	1,225	352 (87)	12,460	4,324	3,107	3,008
F3	69	2,511	1,322	841	825	226 (59)	8,971	2,845	1,919	1,874
F4	28	871	526	447	432	144 (36)	5,237	1,767	1,284	1,254
F5	24	788	453	280	275	197 (50)	7,285	2,234	1,626	1,615
F6	31	1,131	572	502	494	110 (28)	4,100	1,139	904	903
F7	11	391	153	134	134	70 (14)	2,405	623	454	381
F8	9	357	217	160	160	45 (13)	1,660	589	325	321
F9	7	321	122	104	104	12 (3)	398	164	133	133
F10	2	26	15	14	14	37 (7)	1,383	478	261	255
Total	525	16,516	7,994	6,208	6,072	1,961 (468)	69,934	22,965	17,372	17,041
Unviable	85	8,522	1,786	136	-	8	46,969	5,593	331	-
Survival rate (%)	83.8	48.4	77.7	97.8	97.8*	98.3	32.8	75.7	98	98.1*
Loss (%)	16.2	51.6	22.3	2.2	(36.8**)	1.7	67.2	24.3	2.0	24.4**

^aNumber of engorged females individualized^a or grouped^b; founders of the respective generations.

^bNumber of rearing pots used are indicated in parenthesis; (+) ratio of eggs/females blood-fed; (++) ratio of adult/eggs.

generation (25.9%), while in GF, this index was greater in the F1 generation (Table 1).

Regarding the mortality rate of immature stages (Table 1), we found a high rate of non-viability of eggs in both groups (IF = 51.6% and GF = 67.2%). The pupal stage showed lower mortality in both groups (1.9%). The larva stage showed a mortality rate above 20% in both groups (IF = 22.3%; GF = 24.3%).

For the biological studies, including numbers of eggs per female, a period of development of the immature stages, and duration of the complete life cycle, we considered only the results of individualized females. The average number of eggs was 33 ± 7.9 eggs per female. The period for the hatching of eggs in larvae lasted an average of 5 ± 0.2 d (Table 2). The larval stage had the longest period in the insect's life cycle, with an average of 16 ± 0.2 d, followed by the pupal stage (7 ± 0.3 d). The complete life cycle of insects raised in the laboratory lasted an average of 28 ± 0.5 d (Table 2).

In both groups, there was a greater number of female emergence. In IF, with 50.8% of emerged females and males with 49.2% and in GF, the result was similar, in which we observed a percentage of 51.6% females and 48.4% males. However, we did not observe significant differences for IF ($U = 135,600$; $P = 0.8023$) or for GF ($U = 100,900$; $P = 0.1831$; Table 3).

The interval between each generation (F1 to F10) of IF varied from 35 to 234 d, with an average of 65 ± 59 d (Fig. 3). The generation of IF that took the longest (time in days) to emerge was F4, lasting 234 d. In GF, the interval varied from 22 to 102 d, with an average of 47 ± 20 d; the generation that took the longest (time in days) to emerge was F3, lasting 102 d.

Discussion

The taxon *Lu. longipalpis* is often considered to be a complex of cryptic species distributed across various regions of the Americas. This consideration is due to the occurrence of substantial behavioral, morphological, and biochemical polymorphism among geographic populations (Ward et al. 1983, Hamilton et al. 1996, Dujardin et al. 1997, Dias et al. 1998, Mukhopadhyay et al. 1998, Yin et al. 1999). As a result of this, the importance of this vector for public health (MS/SVS 2014), and its high adaptation to urban environments, the establishment of colonies from various geographical regions is essential for understanding its life cycle and increasing information about susceptibility to parasites of the genus *Leishmania*.

In Northeast Brazil, there is a high degree of genetic variation among the natural populations of *Lu. longipalpis* from different locations (Silva et al. 2011). In the state of Maranhão, only one unsuccessful attempt at colonization of this species was carried out in the municipality of Imperatriz (Braga et al. 2011). Thus, the natural populations of *Lu. longipalpis* from Maranhão did not have their biological aspects properly studied. In contrast, in this study, the natural population of *Lu. longipalpis* showed good adaptation for laboratory conditions: Males and females copulated, females fed on mice both in light and dark conditions, and the production of a substantial number of adults from laboratory generations demonstrated that the insects reproduced satisfactorily.

In our study, productivity (i.e., obtaining healthy adults sand flies born in laboratory conditions) was useful in both breeding methods used (individualized or grouped females); in both, females engorged in the company of males. However, logistically, it is more advantageous to keep females grouped in the same container, as larger numbers of individuals are obtained simultaneously than if each female were individually placed in each different containers. Using the latter method, we would generate fewer insects for each

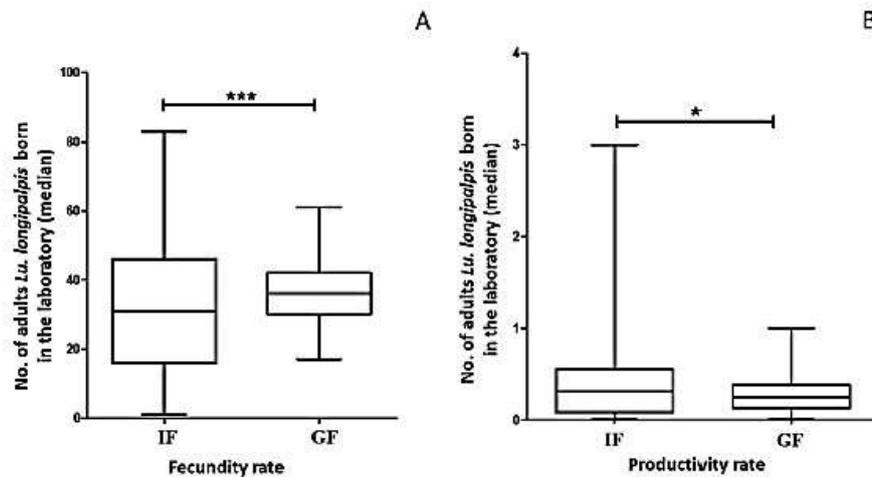


Fig. 2. Fecundity (A) and productivity (B) rates between methods (IF—Individualized Females and GF—Grouped Females). Asterisks indicate statistical differences, ****P*-value = 0.0001 and **P*-value = 0.0191.

generation. This method of grouping females was previously demonstrated by Killick-Kendrick et al. (1977) and Modi and Tesh (1983) and was detailed by Oliveira et al. (2015). The latter investigators demonstrated greater efficiency in productivity in these conditions of grouping. This result probably occurred because large numbers of females cohabited in the same rearing pot. A similar phenomenon was observed in a colony of *Psathyronomyia shannoni* (Dyar, 1929) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in which oviposition was directly influenced by the density of cohabitation, as the density of eggs increased with the number of sand flies per rearing container (Souza et al. 1995, Schlein and Jacobson 1999). According to Volf and Volfova (2011), aggregations stimulate blood feeding, copulation, and egg production.

Colonizing sand fly species is not straightforward. The vector species *Lu. longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Old World species) are the ones most adaptable to laboratory conditions (Killick-Kendrick et al. 1977, Pimenta et al. 2012), probably due to their flexibility to inhabit man-altered environments and to feed on domestic animals (Quinnell et al. 1992, Morrison et al. 1993, Sherlock et al. 1996, Dias et al. 2003, Marassá et al. 2006, Oliveira et al. 2008, Diniz et al. 2014, Guimarães-e-Silva et al. 2017). In our experiment, the insects took blood meals from Swiss mice, animals not yet reported as a blood source for sand flies raised in the laboratory. The more common animals used for colonies and experimental studies are golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) and Balb/c mice (Costa and do Valle 2014, Porrozi et al. 2014).

We also noted that *Lu. longipalpis* was quite tolerant to the size of the rearing containers used in this study (5 cm in diameter by 6.5 cm in height, capacity 100 ml), as the different immature stages developed well in containers with high densities of individuals. This differs from other sand flies species: for example, *Phlebotomus (Adlerius) arabicus* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) showed a decrease in population in these conditions, as their larvae compete vigorously for space, leading them to cannibalism or escape to the surface of the container, which is drier and causes larval desiccation and death (Volf and Volfova 2011).

The life cycle of our sand flies (28 d on average) was similar to that observed by Brazil et al. (1997), who reported an average of 29.5 d (Females collected in Gruta da Lapinha, state of Minas

Gerais [MG], and raised in Fundação Oswaldo Cruz, MG), but differed from that observed by Rangel et al. (1987), who reported a range of 29–36 d (females collected in Gruta da Lapinha, MG and raised at the Federal University of Rio de Janeiro). Even so, this is relatively shorter than the period of other species, as observed in the colonies of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (life cycle of 32 d) and *Evandromyia leuti* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (more than 40 d; Brazil et al. 1997). In Colombia, this period was longer for *Pintomyia (Pifanomyia) spinicrassa* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), ranging from 58 to 78 d (Morales et al. 2005).

The pupa was the immature stage with the lowest mortality (2%) and was more resistant to fungal contamination than egg and larva since we did not observe fungi associated with pupae. A hypothesis for low pupal mortality is that they did not feed and preferred drier environments than larvae. In dry environments, they are more challenging to develop fungi.

Several studies demonstrated that the numbers of male sand flies captured from the field were much greater than that of females (Rebêlo et al. 1999a, b; Barros et al. 2000; Martin and Rebêlo 2006; Guimarães-e-Silva et al. 2012, 2017; Penha et al. 2013; Ribeiro da Silva 2019). However, this finding does not mean that more males are born than females, as our results showed that female hatchings predominated over males' (even though there is no significant difference between the sexes). These data corroborate laboratory observations by other authors (Killick-Kendrick and Killick-Kendrick 1977, Modi and Tesh 1983, Luitgards-Moura et al. 2000, Oliveira et al. 2015).

The interval between each generation of the IF group was longer from generation F3 to generation F4 (234 d); however, after consecutive generations, this period stabilized. In the GF group, the interval was longer from generation F2 to generation F3 (102 d). The GF group had fewer variations, with shorter time intervals (in days) between generations than the IF. This finding suggests that the grouped method is more efficient. The determination of the period between each generation is vital to indicate when a given colony can be considered established in the laboratory. Considering that the period of production of adults from generation F1 to F5 (group IF) lasted 404 d, and in the GF group, it lasted 226 d, we conclude that a colony can be established in the laboratory in less than a year (\pm 8 mo).

Table 2. Number of eggs laid per female and period (in days) for the development of each immature stage, observed in insects captured in the field (P) and in 10 generations of *Lu. longipalpis* reared in the laboratory, from 2017 to 2019

Generations	No. eggs/females		Time in days of hatching eggs in larvae		Time in days of larvae development for pupal transformation		Time in days from pupal development to adult emergence		Time in days for the complete life cycle (eggs-adult)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Parental	29	17.9	6	0.8	1.6	1.6	7	1.3	28	2.4
F1	28	19.4	5	0.5	1.5	1.3	6	0.7	27	1.9
F2	33	18.9	5	0.5	1.5	1.0	7	0.7	27	1.4
F3	36	17.5	5	0.6	1.5	1.0	7	0.3	28	1.3
F4	31	18.6	5	0.5	1.6	1.1	7	0.5	28	1.6
F5	33	19.9	5	0.5	1.5	0.6	7	0.4	27	0.8
F6	37	17.3	5	0.4	1.6	0.8	7	0.4	28	1.2
F7	36	15.8	5	0.4	1.5	0.8	7	0.4	27	1.1
F8	40	8.4	5	0.5	1.6	0.5	7	0.3	28	1.1
F9	46	11.9	5	0.5	1.6	0.5	6	0.5	26	1.4
F10	13	11.0	5	0.0	1.6	0.0	7	0.0	28	0.0
All generations	33	7.9	5	0.2	1.6	0.2	7	0.3	28	0.5

F1 to F10, first to tenth generation; %, percentage; SD, standard deviation.

Table 3. Frequency of adult insects according to sex (male or female) for 10 generations, from 2017 to 2019

Groups	IF—individualized females			GF—grouped females		
	Male	Female	Total	Male	Female	Total
Generations	No.	%	No.	%	No.	%
F1	767	48.8	805	51.2	1,530	47.9
F2	364	43.5	473	56.5	1,986	48.4
F3	622	50.8	603	49.2	1,476	49.1
F4	401	48.6	424	51.4	885	47.2
F5	223	51.6	209	48.4	615	49.0
F6	161	58.6	114	41.5	797	49.4
F7	235	47.6	259	52.4	438	48.5
F8	73	54.5	61	45.5	199	52.2
F9	83	51.9	77	48.1	146	45.5
F10	50	48.1	54	51.9	56	42.1
All generations	2,979	49.2	3,079	50.8	8,128	48.4
U/P-value			135,600/0.8023		100,900/0.1831	

U = Mann-Whitney value.

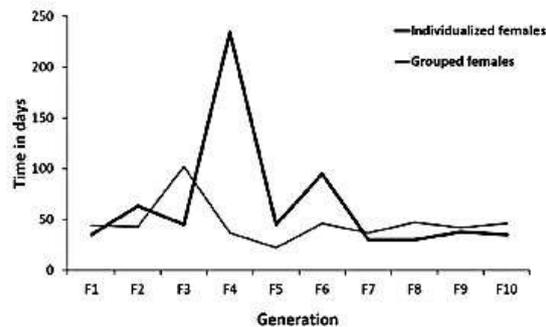


Fig. 3. Period (in days) for the appearance of each generation (F1 to F10) of individualized and grouped females, from 2017 to 2019.

Our results demonstrate that the population of *Lu. longipalpis* presented excellent adaptation for the establishment of experimental colonies. However, they also demonstrate that the life cycle period of *Lu. longipalpis* varies according to the population studied but does not avoid the provision of sufficient numbers of adults to perform experiments, especially those related to the understanding the interactions regarding parasites that cause AVL and ATL and their vertebrate hosts.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *Journal of Medical Entomology* online.

Figure 1S. Location of the collection point surveyed in the municipality of Raposa, São Luís, Maranhão, Brazil, from 2017 to 2019.

Acknowledgments

We thank Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) for providing scholarships for R. C. Ribeiro-da-Silva. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA universal process 00967/17. We also thank the team of the Entomology and Vectors Laboratory of the UFMA for the collaboration in the capture of phlebotomine and logistics.

References Cited

Arrivillaga, J. C., and M. D. Feliciangeli. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38: 783–790.

Barata, R. A., J. C. França-Silva, W. Mayrink, J. C. da Silva, A. Prata, E. S. Lorosa, J. A. Fiúza, C. M. Gonçalves, K. M. de Paula, and E. S. Dias. 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.* 38: 421–425.

Barros, V. L. L., J. M. M. Rebêlo, and F. S. Silva. 2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de caçoeira do município do Paço do Lumiar, estado do Maranhão, Brasil: área de transmissão de leishmaniose. *Cad. Saude Publica.* 16: 265–270.

Braga, G. M. S., L. C. Alves, and L. B. G. Silva. 2011. Agentes fúngicos e bacterianos numa colônia em nível laboratorial de *Lutzomyia longipalpis* População Imperatriz. *PUBVET.* 5: 1–12.

Brazil, R. P., and B. G. Brazil. 2003. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais, p. 266. In *Flebotomíneos do Brasil. Colonização em Laboratório*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Brazil, R. P., V. L. Carneiro, J. D. Andrade Filho, J. C. M. Alves, and A. L. Falcão. 1997. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). *An. da Soc. Entomológica do Bras.* 26: 191–193.

Conceição-Silva, F., and C. R. Alves. 2014. Leishmanioses do continente Americano, p. 512. In *Leishmanioses do continente Americano*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Costa, S. C. G., and T. Z. do Valle. 2014. Modelos Experimentais na Leishmaniose Tegumentar Americana, pp. 293–307. In *Leishmanioses Do Cont. Am.* Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Deane, L. M., and M. P. Deane. 1957. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no noroeste do Estado do Ceará. *Rev. Bras. Malar Doen. Trop.* 9: 225–246.

Dias, E. S., C. L. Fortes-Dias, J. M. Stiteler, P. V. Perkins, and P. G. Lawyer. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. *Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo.* 40: 49–53.

Dias, F. de O. P., E. S. Lorosa, and J. M. M. Rebêlo. 2003. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saude Publica.* 19: 1373–1380.

Dias, E. S., J. C. França-Silva, J. C. da Silva, É. M. Monteiro, K. M. de Paula, C. M. Gonçalves, and R. A. Barata. 2007. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.* 40: 49–52.

Diniz, M. M. C. de S. L., F. Galvis Ovallos, C. M. de Castro Gomes, C. de Oliveira Lavitschka, and E. A. Bianchi Galati. 2014. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasit. Vectors* 7: 139.

Dujardin, J. P., E. M. Torrez, F. Le Pont, D. Hervas, and D. Sossa. 1997. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med. Vet. Entomol.* 11: 394–400.

Fonteles, R. S., A. A. Pereira Filho, J. L. P. Moraes, S. R. F. Pereira, B. L. Rodrigues, and J. M. M. Rebêlo. 2018. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification in sand flies (Diptera: Psychodidae) from Lençóis Maranhenses National Park Region, Brazil. *J. Med. Entomol.* 55: 445–451.

Forattini, O. P. 1973. *Entomologia Médica*. Editora Blucher, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 658 p.

Galati, E. A. B., and E. F. Rangel. 2003. Morfologia e taxonomia. *Flebotomíneos do Bras.* 1: 23–51.

Gontijo, C. M. F., and M. N. Melo. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 7: 338–349.

Guimarães-e-Silva, A. S., S. de O. Silva, R. C. Ribeiro da Silva, V. C. S. Pinheiro, J. M. M. Rebêlo, and M. N. Melo. 2017. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLoS One* 12: e0179052.

Hamilton, J. G. C., R. D. Ward, M. J. Dougherty, R. Maignon, C. Ponce, E. Ponce, H. Noyes, and R. Zeledón. 1996. Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Costa Rica. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90: 533–541.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2018. Cidades e Estados. <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ma/raposa.html>.

Killick-Kendrick, R. 1978. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. *Acta Trop.* 35: 297–313.

Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, and P. D. Ready. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae) 1. *J. Med. Entomol.* 13: 429–440.

Lainson, R., and B. F. Rangel. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 811–827.

Lawyer, P., M. Killick-Kendrick, T. Rowland, E. Rowton, and P. Volf. 2017. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) TT—Établissement de colonies de laboratoire et élevage de masse des phlébotomes (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 24: 42.

Luitgards-Moura, J. F., E. G. Castellón Bermúdez, and M. G. Rosa-Freitas. 2000. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 251–257.

6.2 CAPITULO 2:

Artigo a ser submetido à publicação

Artigo 2: Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in mice

Rosa Cristina Ribeiro da Silva^{1,2,3}, Léo Nava Piorsky Dominici Cruz^{2,3}, João Manoel da Silva Coutinho^{1,3}, Carlos Eduardo Fonseca-Alves⁴, José Manuel Macário Rebêlo³, Silma Regina Ferreira Pereira²

¹Postgraduate Program in Health Science, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brazil

²Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brazil

³Laboratory of Entomology and Vectors, Department of Biology, Federal University of Maranhão - UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brazil

⁴Institute of Health Sciences, Paulista University – UNIP, Campus Bauru, Luís Levorato Street, 130, 17048-290, Bauru, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) (Lutz & Neiva 1912) is permissive for several *Leishmania* species and predominates in some areas endemic for cutaneous leishmaniasis (CL), where sandflies that are typically incriminated in its transmission are rare or absent. For this reason, we investigated whether *L. longipalpis* can induce CL through *L. amazonensis* transmission. For that, 291 sandflies took an initial blood meal in mice infected with *L. amazonensis*. After feeding, 52.6% were positive for *Leishmania* DNA. Of these, 17 (of which 58,8% were positive for *Leishmania* by dissection of the intestine) performed a second feeding on uninfected mice. After 27 days of infection, one mouse presented characteristic leishmania edema. Limiting dilution tests and immunohistopathological analyses confirmed the occurrence of promastigote and amastigote forms, respectively, on the animal's skin. Parasite DNA was also detected in paw lesions and inguinal lymph nodes. DNA sequencing confirmed the *Leishmania* species in both insects and mice. The results confirm the ability of *L. longipalpis* to become infected and experimentally transmit *L. amazonensis* to rodents, inducing leishmaniotic lesions.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Experimental infection, Host-parasite interaction, Permissive vector, Vectorial ability, Vectorial competence.

***Corresponding author:** Rosa Cristina Ribeiro da Silva; email: rosinhachris@gmail.com; adress: Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brazil, Zip: 65080-805

Introduction

Lutzomyia longipalpis is the most relevant vector of *Leishmania (Leishmania) infantum* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), the transmitting etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL) in the New World (Brasil, 2019). Nevertheless, natural infection (Paiva et al., 2006; Paiva et al., 2010, Lana et al., 2015; Lara-Silva et al., 2015; Pereira Filho et al., 2015; Guimarães-e-Silva et al., 2017; Fonteles et al., 2018) and experimental infection studies (Coelho & Falcão, 1962; Coelho et al., 1967; Rogers et al., 2004; Alexandre et al., 2020) have highlighted its capacity to sustain the development of other *Leishmania* species. Despite this permissiveness, there are few studies regarding the ability of this insect to transmit parasites, such as for *L. braziliensis* (Coelho & Falcão, 1962), *L. mexicana* (Rogers et al., 2004), and *L. major* (Cecílio et al., 2020).

Cutaneous leishmaniasis (CL) has spread in urban environments (Caldart et al., 2017; Carneiro et al., 2018) where *L. longipalpis* feeds on several domestic and synanthropic animals (Guimarães-e-Silva et al., 2017; Oliveira et al., 2008; Diniz et al., 2014) and it presents a higher adaptive capacity to seasonal variations than other sandflies species (Ribeiro-da-Silva et al., 2019). Moreover, studies have reported the circulation of several species of *Leishmania* concomitantly with *L. longipalpis* in Brazil (Paiva et al., 2006; Paiva et al., 2010; Lana et al., 2015; Lara-Silva et al., 2015; Pereira Filho et al., 2015; Guimarães-e-Silva et al., 2017; Fonteles et al., 2018). These facts have generated the hypothesis that *L. longipalpis* may be related to CL, especially in areas where its vectors are rare (Caldart et al., 2017; Dias et al., 2011; Valderrama et al., 2011). The present study is the first to demonstrate the ability of *L. longipalpis* to transmit *L. amazonensis* to rodents, inducing cutaneous lesions.

Materials and Methods

Sandflies, parasite, and mice

Specimens of *L. longipalpis* were created in the laboratory, free from *Leishmania* infection, as previously described (Ribeiro-da-Silva et al., 2021). Twelve hours before the experiments, the feeding of the female sand flies was suspended to increase the likelihood of insects feeding on the mice infected by *L. amazonensis* (IFLA/BR/1968/PH8), whose promastigotes were grown in Schneider medium (Sigma, St Louis, MO, USA), supplemented with 1% antibiotic (Penicillin 100 µL/ mL and streptomycin 50ul / ml) and 20% inactivated bovine fetal serum (GIBCO), and kept in an incubator at 27 °C.

Balb/c mice (*Mus musculus*), weighing 25 g, were obtained from the Vivarium of the University of Campinas, São Paulo, Brazil, under pathogen-free conditions. The animals were kept in polycarbonate boxes under controlled conditions: temperature 21 ± 2 °C and an alternating light-dark cycle of 12 h. This study was approved by The Ethics Committee on Animal Experimentation/UFMA (23115.006003/2017-11).

Experimental infection of mice for the 1st blood meal

Eight male Balb/c mice, aged 15 weeks, were experimentally infected on the right hind paw with 10^7 *L. amazonensis* promastigotes in the stationary phase, as described by (De Jesus Pereira et al., 2015). On the 41st day after infection, the mice were anesthetized (300 mg/kg of ketamine and 60 mg/kg of xylazine) to feed the female sandflies emerging in the insect colony. The animals were placed in cages lined with nylon and glass, with metal frames (30 × 30 × 30 cm) placed in a biochemical oxygen demand (BOD) oven, in the dark, with a temperature of 27 °C and relative humidity of 80%.

Immunosuppression of mice for the 2nd blood meal

Four male Balb/c mice without *Leishmania*, aged 35 weeks and weighing 28 g, had their susceptibility to infection increased by receiving a single dose of cyclophosphamide (50 mg/kg/mouse) intraperitoneally (Hafeez et al., 2001). After 48 hours, the animals were anesthetized and subjected to xenodiagnosis under the same protocol described above.

Experimental design

First, infection experiments (called ExpA) were carried out, which refer to the infection of *L. longipalpis* by *L. amazonensis* by biting experimentally infected mice (1st blood meal). The tests were carried out according to the number of available females emerging in the insect colony, totaling 485 females at three to four days of life, from the F1, F2, and F3 generations. Eight infected Balb/c mice were placed inside a cage to serve as a food source for sandflies so that two animals were exposed to the same group of sandflies sequentially for 60 minutes each. Each group (27 to 65 females/animal) had a total of 120 minutes available to feed, totaling 12 blood meal attempts (groups I–XII). Figure 1A shows the scheme of experimental insect infection.

The transmission experiment (called ExpB) refers to the transmission of *L. amazonensis* to a healthy mouse through the bite of *L. longipalpis* from ExpA during the insect's second

blood meal (Figure 1B). ExpB was performed after 5 to 10 days of ExpA by offering an immunosuppressed and infection-free animal as a food source for insects for 60 minutes. The insects fed on four animals during 12 attempts, of which two survived for, at last, two months after the feeding.

All engorged females from the first or second feeding were investigated for the presence of the parasite by bowel dissection and *Leishmania* DNA detection. The experimental infection rate was determined as the number of positive females for *Leishmania* in relation to the total number of engorged females (Paiva et al., 2006). Supplementary Material Table 1 displays all groups used in each assay and the rates of engorged females, experimental infection rates, and animal outcomes after being a food source for sandflies.

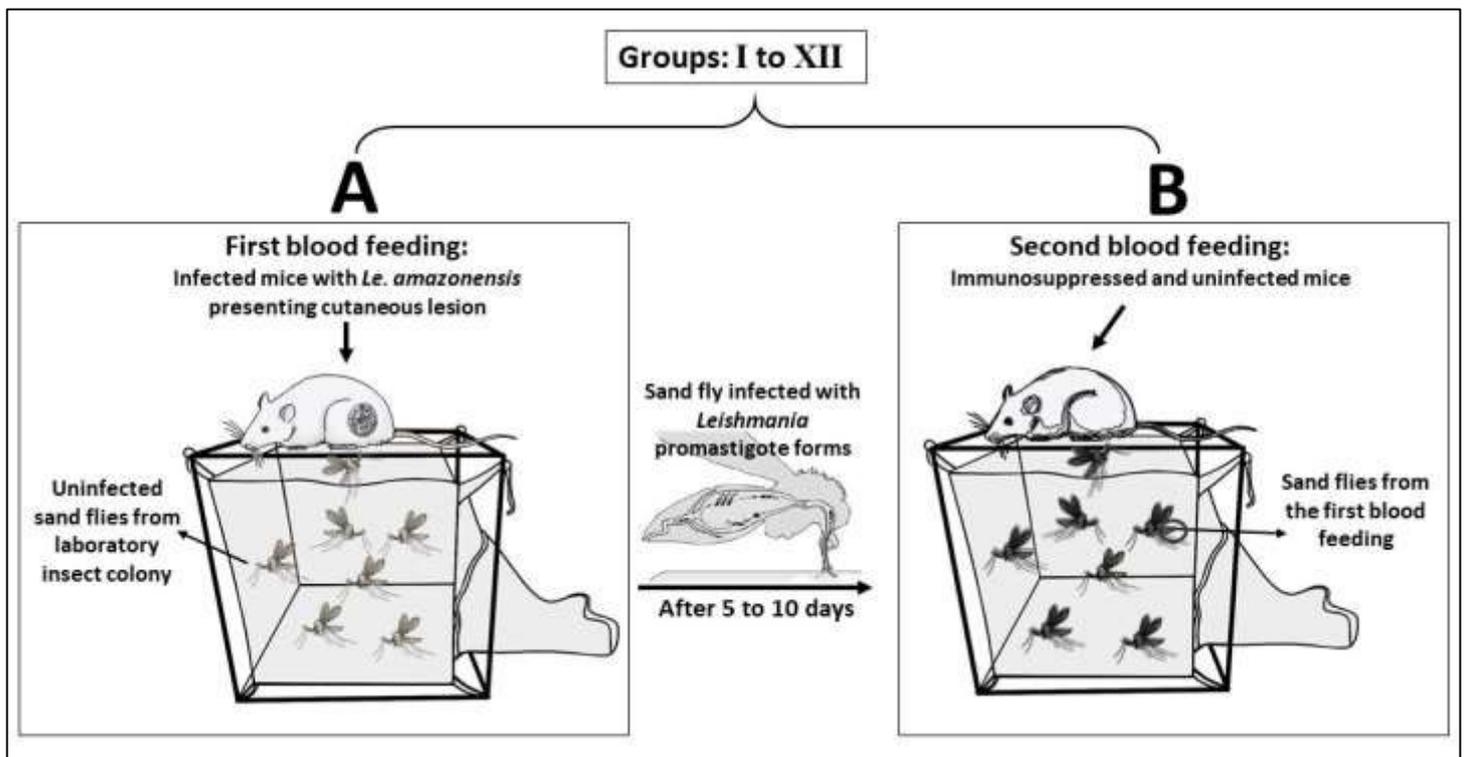


Figure 1. Experimental design of *Lutzomyia longipalpis* infection through blood meal in animals infected with *Leishmania amazonensis* (A); Transmission of *Leishmania amazonensis* to immunosuppressed mice via the bite of *Lutzomyia longipalpis* previously fed on experimentally infected mice (B).

Dissection of engorged Lutzomyia longipalpis

All females (N = 17) that underwent the second blood meal were dissected to record the presence or absence of *L. amazonensis* promastigotes in the intestine. The females were quantified and anesthetized for 5 minutes at -20°C and individually dissected in drops of 0.9% NaCl, exposing the intestine to observe the presence of promastigote forms under an optical microscope.

Leishmania amazonensis DNA confirmation by polymerase chain reaction and sequencing

Engorged females (N = 291) and samples of the mice used in the transmission test (lesion of the paw, spleen, liver, and inguinal lymph node) had their DNA extracted for detection of *Leishmania* DNA by amplifying a 300 to 350 base pair (bp) fragment of the *ITS-1* gene, using LITSR primers (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') according to a previous study (Schönian et al., 2003). Amplified DNA was purified using ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent; (ThermoScientific™), and the DNA sequencing was performed by the company ACTGene Análises Moleculares Ltda. The strings were deposited on the GenBank platform of the National Center for Biotechnological Information, under the access numbers available in Supplementary Material Table 2 and Table 3. The sequences obtained were aligned with sequences of the *ITS-1*, and the phylogeny reconstruction was performed following previous studies (Kumar et al., 2018; Soares et al., 2020).

Determination of parasitic load

To confirm that *L. amazonensis* was transmitted via *L. longipalpis*, the mice were examined weekly for their general physical condition (shedding of hair and changes in the skin condition) and the appearance of skin lesions. When there were clinical signs suggestive of infection, the mouse was euthanized by anesthetic overdose (60 mg/kg of xylazine and 300 mg/kg of ketamine), and spleen, liver, lymph nodes, and skin lesions of the paw and snout were collected for the investigation of the presence of the parasite.

The parasitic loads of the spleen, liver, inguinal lymph node, and foot injuries were determined using the limiting dilution method (Castelo-Branco et al., 2019). This assay was performed in duplicate and incubated at 27°C . After 24, 48, and 72 h, the samples from each well were analyzed and defined as positive or negative, depending on the presence or absence

of promastigotes in each well. The total number of parasites/samples was calculated as described by (Rodrigues et al., 2009).

Histopathological and immunohistochemistry analysis

Fragments of spleen, liver, and skin lesion of the left paw were collected, fixed in 10% formaldehyde for 24 hours, and later processed and embedded in pure paraffin. Subsequently, 5- μ m sections were made, and the slides were stained using the hematoxylin and eosin, and Giemsa techniques (Junqueira & Carneiro, 2017). Histological sections were observed under a light microscope (40X).

The immunohistochemical analysis was performed to identify amastigotes in the skin, spleen, and liver, as previously described (Tafari et al., 2004). Briefly, serum from a dog naturally infected by *Leishmania* was used as a primary antibody, and a goat anti-mouse polymer was used as a secondary antibody. The immunohistochemistry assay was stained with 3 3'-diaminobenzidine, and tissue samples were counterstained with Harris hematoxylin. Immunohistochemistry analysis was considered positive when amastigotes were visualized stained in brown color. In this manner, samples were scored as positive or negative. We used spleen samples from a non-infected mouse and samples with amastigotes identified by histology as a negative and positive control.

The proportion of blood-feeding and mortality of Lutzomyia longipalpis

We calculated the proportion of females who performed blood-feeding (PBF) in the infected mouse and the healthy mouse. The mortality proportion (PM) was calculated as the number of engorged females killed after the first blood meal in relation to the total number of females that were engorged, dead, or survived (Diniz et al., 2014). The differences between the first and second feeding proportions were analyzed using a non-parametric Mann–Whitney test ($p < 0.05$).

Results

The proportion of blood-feeding and mortality of Lutzomyia longipalpis

We used 485 female sandflies in the infection tests distributed in groups I–XII, which were exposed to feed on eight mice infected with *L. amazonensis* (ExpA). Of these, 291 (60%) took the first blood meal, with a mortality proportion of 0.50 ($p = 0.0001$), of which 146 (50%)

were exposed to the second feeding, with a mortality proportion of 0.12, with a significant difference in the proportion of first blood meal mortality (ExpB) (Supplementary Table 1). Of these females exposed to the uninfected animal (ExpB), only 17 (12%) took the second meal, with a proportion ranging from 8% to 75% per animal (Table 1). The sandfly females were preferably fed on the mice's snouts and feet; however, feeding was sporadically observed on the animal's tail, ears, and eyelids.

Table 1. Proportions of engorged females and proportion of mortality of *Lutzomyia longipalpis* females who performed blood feeding during xenodiagnosis, according to the first (ExpA) and the second (ExpB) blood meals.

Groups	ExpA: First blood meal					ExpB: Second blood meal		
	TF	EF	PBF	TFD	PM	TF	EF	PBF
I	38	11	0.29	7	0.64	4	3	0.75
II	41	9	0.22	6	0.67	3	1	0.33
III	29	6	0.21	0	-	6	1	0.17
IV	37	11	0.30	5	0.45	6	0	-
V	65	34	0.52	23	0.68	11	0	-
VI	50	28	0.56	11	0.39	17	0	-
VII	57	40	0.70	26	0.65	14	5	0.36
VIII	32	31	0.97	20	0.65	11	0	-
IX	30	27	0.90	5	0.19	22	2	0.09
X	27	19	0.70	19	1.00	0	0	-
XI	51	48	0.94	12	0.25	36	3	0.08
XII	28	27	0.96	11	0.41	16	2	0.13
Total	485	291	0.60	145	0.50	146	17	0.12
Mean (SD)			0.61 (0.27)		0.54 (0.21)			0.25 (0.22)

TF means Total females exposed to feed on the mice; **EF** means Engorged females; **PBF** means Proportion of blood-feeding; **TFD** means Total Females dead after the first blood meal; **PM** means Proportion of mortality of the first blood meal; **SD** means Standard deviation.

Experimental infection of sandflies by Leishmania amazonensis

Of the 291 females of *L. longipalpis* that took the first blood meal in a mouse infected with *L. amazonensis*, we identified *Leishmania* DNA in 153 insects (infection rate = 52.6%; Table 2, Figure 2A). Additionally, in a total of 21 females were dissected, ten (47.6%) had flagellate forms of the parasite in their intestines (Table 2).

Table 2. Experimental infection rate and number of dissected *Lutzomyia longipalpis* females exposed to the first blood meal (ExpA) of mice infected with *Leishmania amazonensis*.

Groups	Engorged Females	*Intestine Dissection (+)	**PCR	#Infection rate (%)
I	11	3 (3)	6	54.5
II	9	1 (0)	7	77.8
III	6	1 (1)	4	66.7
IV	11	0	11	100.0
V	34	2 (0)	11	32.4
VI	28	0	23	82.1
VII	40	5 (2)	19	47.5
VIII	31	1 (1)	4	12.9
IX	27	2 (1)	20	74.0
X	19	0	10	52.6
XI	48	3 (2)	20	42.0
XII	27	3 (1)	18	52.0
Total	291	21 (10)	153	52.6

*means Number of females, whose intestine was dissected to investigate the presence of *Leishmania*; (+) means Number of females, in which the parasite was observed in the intestine.

**PCR means Positive Polymerase chain reaction for *Leishmania* DNA

#Calculated through the number of females positive for *Leishmania* DNA in relation to the number of engorged females.

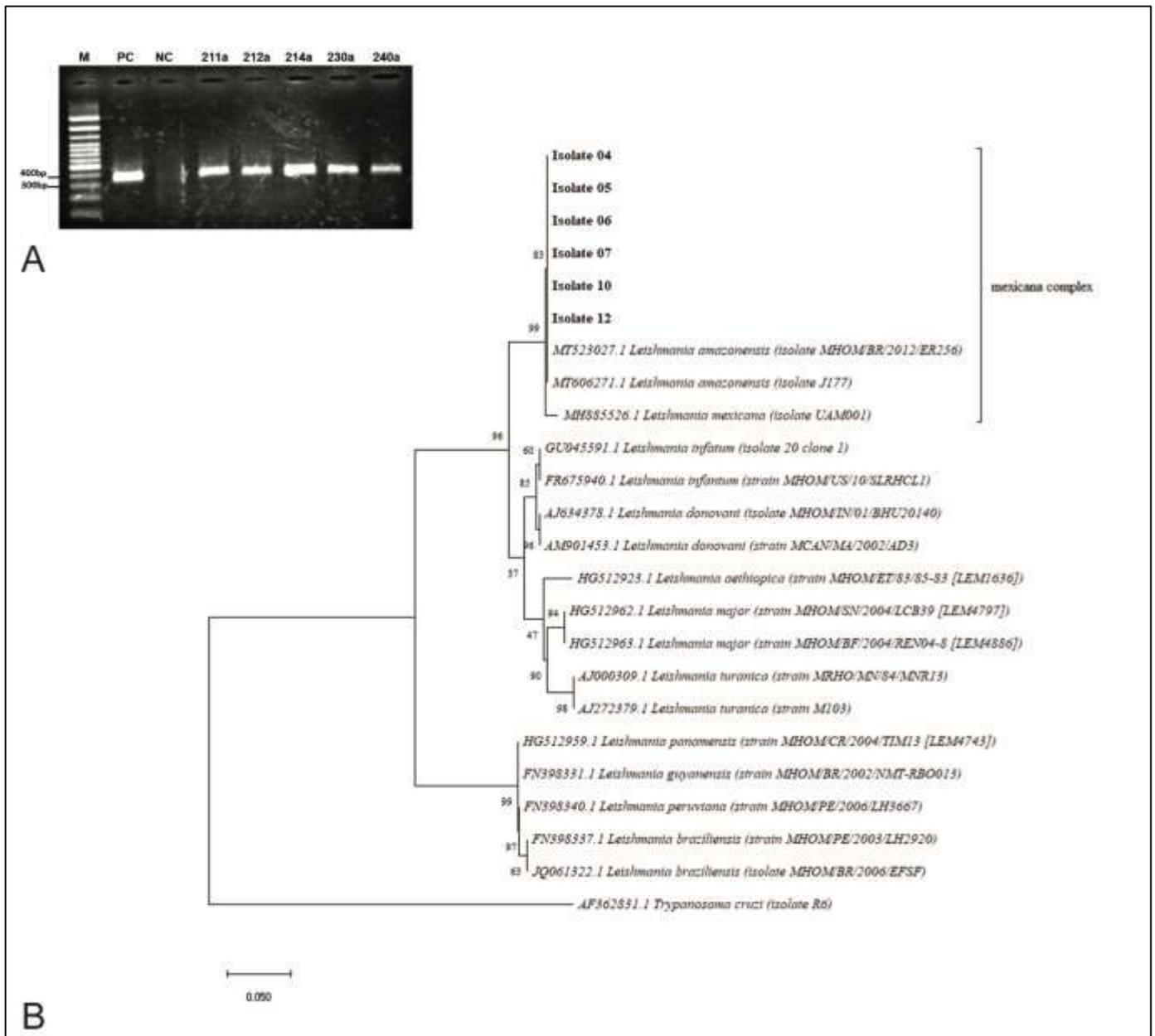


Figure 2. Confirmation of *Leishmania amazonensis* DNA in *Lutzomyia longipalpis* fed on infected mice (A): Agarose gel (1%) showing amplified 300-350 bp products with the primers for *Leishmania ITS1*. M = 100bp marker; PC: positive control; NC: negative control; 211a - 240a: positive samples. (B) Evolutionary scenario of *ITS-1* gene inferred by the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The branch lengths are in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Sequences from our study are highlighted in bold. Brackets indicate sequences from the Mexican complex (including *Leishmania amazonensis* and *Leishmania mexicana*). *Trypanosoma cruzi* is the outgroup.

Transmission of Leishmania amazonensis to mice by Lutzomyia longipalpis

For this analysis, we considered only groups IX, XI, and XII, whose females had made the first blood meal (N = 74), of which seven were able to perform the second blood meal on two uninfected mice that survived for at least, two months after the bites (called animal A and animal B). We observed promastigotes in 57% of these sandflies. A similar transmission rate (58.8%) was found in all 17 females fed on the four uninfected mice.

Animal A. Eight days after the first blood-feeding, 22 surviving insects were subjected to a second blood meal in animal A. Of the 22 females, only two insects performed the second feeding in this mouse (Table 3), one of which was positive for the presence of *Leishmania* promastigotes. Nevertheless, after 96 days of observation of the animal, there were no clinical signs of the disease. This animal was sacrificed, and the limiting dilution test revealed no promastigote forms, indicating no transmission of the parasite to Animal A.

Animal B. This animal was subjected twice, at different times, to the second blood-feeding of the sandflies (in groups XI and XII):

In group (XI): After seven days of the first blood-feeding, 36 females were subjected to a second blood meal in animal B, and only three females (8%) were able to perform the second feeding, of which 2/3 were later confirmed as positive by intestine dissection and polymerase chain reaction (PCR) (Table 3). Concerning group XII: After six days of the first blood-feeding, a total of 16 females were subjected to a second meal in Animal B, and only two (12.5%) were successful in feeding, of which 1/2 was later confirmed to be positive by dissection and PCR (Table 3). In total, animal B was bitten by five females, of which three (60%) were infected with *Leishmania*. The animal was observed for 67 days, which showed a lesion (slight swelling) in the left upper paw on the 27th and 22nd days after exposure to females from groups XI and XII, respectively. Figure 3 shows the lesion's progression.

Table 3. Number of females of *Lutzomyia longipalpis* who underwent the second blood meal in two uninfected immunosuppressed mice (A and B) and the total of females diagnosed as positive for *Leishmania* through direct observation of parasites by intestinal dissection and DNA detection by polymerase chain reaction (PCR).

Group / animal	Incubation*	Females exposed to the 2 nd blood meal	Engorged Females	Females infected with <i>Leishmania</i>	
				Intestine Dissection	PCR
IX/ Animal A	8	22	2	1	1
XI/ Animal B	7	36	3	2	2
XII/ Animal B	6	16	2	1	1
Total	-	74	7	4	4

* means Number of days after 1st blood meal

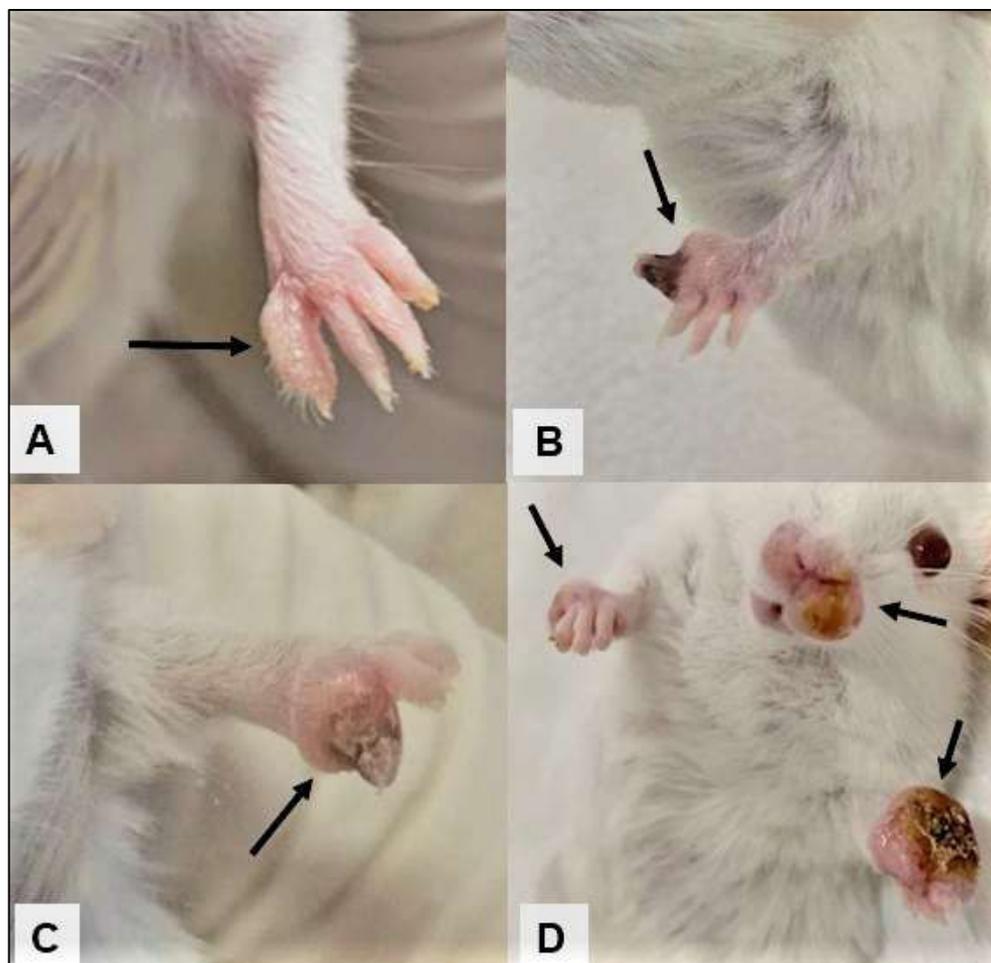


Figure 3. Progression of the lesion observed in the mouse (Animal B) bitten by *Lutzomyia longipalpis* infected with *Leishmania amazonensis*. In (A) 27 and 22 days after the bite; (B) 47 and 42 days; (C) 55 and 50 days; (D) 67 and 62 days concerning groups XI and XII, respectively.

Parasitic loading and DNA sequencing

At 10 weeks after exposure to the bites of infected insects, animal B was euthanized. The limiting dilution test demonstrated that *Leishmania* spread from the paw (location of the insect bite) to the viscera (spleen, liver, and inguinal lymph node). The parasitic load observed in the spleen was 4.3×10^4 (0.1 g/ml), 3.0×10^3 (0.3 g/ml) in the liver, and 8.9×10^3 (0.03 g/ml) in the inguinal node. The lesion on the paw (origin of the insect bite) showed a greater parasitic load of 9.0×10^4 (0.1 g/ml).

To confirm the origin of the lesion as caused by the bite of *L. longipalpis* infected by *L. amazonensis*, we carried out direct DNA sequencing. The result of the NJ analysis (Figure 2B) confirmed the identity of *ITS-1* fragment sequences obtained from the total DNA of the infected sandflies that took a second meal from Animal B (Isolates 4, 5, 6, and 7) from the lesion sample on the paw of Animal B (Isolate 10), and the sample of the positive control obtained from the cultured strain (Isolate 12). All sequences belong to the same clade of the species *L. amazonensis* in the Mexican complex, indicating that they are the same parasite used in the study.

Histopathology and immunohistochemistry

In the histopathological analysis of the spleen, no morphological changes or the presence of amastigotes were observed in the splenic macrophages. When evaluating the spleen samples using Giemsa stain, no macrophages with *Leishmania* amastigote forms were identified. In the morphological analysis of the liver, we observed a slight degeneration of hepatocytes; there were no macrophages with amastigote forms observed in the morphological analysis. In the skin lesion analysis, we observed an intense neutrophilic inflammatory infiltrate with an area of necrosis and cellular apoptosis. There is an area of multifocal hemorrhage and collagenolysis. There was a moderate number of macrophages with *Leishmania* amastigote forms and extracellular amastigote forms in areas of cell degeneration (Figure 4A). We identified amastigote forms using hematoxylin and eosin and Giemsa staining.

In the immunohistochemical analysis, no amastigote forms of *Leishmania* were observed in the liver and spleen samples. However, numerous forms of *Leishmania* amastigotes were observed in the skin lesion (Figure 4B). Numerous amastigotes were also observed in regions of degeneration, edema, and cell necrosis.

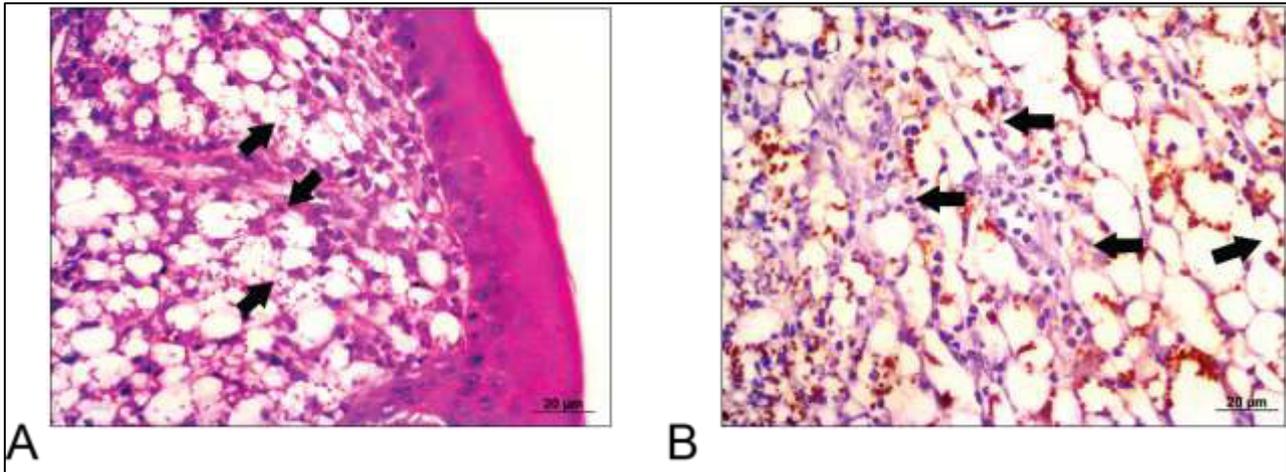


Figure 4. Visualization of *Leishmania* in the mouse bitten for infected sandflies. **(A)** Hematoxylin and eosin staining of a skin lesion showing intense cell degeneration and several amastigotes (arrows) in the degenerate cell cytoplasm. 40x. Scale bar: 20µm. **(B)** Skin lesion from presenting several amastigotes stained in brown color, confirming the *Leishmania* infection origin of this lesion. Immunohistochemistry, Harris hematoxylin counterstaining, 40X.

Discussion

Most studies that seek to understand permissive behavior and the competence of sandflies as *Leishmania* vectors evaluate metacyclogenesis of the pathogen in the vector's intestine without studying the competence of the insect to transmit the pathogen to a host healthy using *in vivo* transmission assays (Alexandre et al., 2020; Agrela et al., 2015; Volf et al., 2004; Sant'Anna et al., 2014).

In the present study, we evaluated the role of the sand fly *L. longipalpis* as a competent vector for *L. amazonensis*, through experimental transmission of the parasite to an uninfected and immunosuppressed vertebrate host via an infected insect bite. To accomplish this, we used the Balb/c mouse as the sole host for the blood-feeding of female *L. longipalpis*, showing itself quite attractive, with a high PBF (≤ 0.50). This observation corroborates several studies performed under laboratory conditions that reported high rates of blood feed proportion for this sandfly (Rogers et al., 2007; Akuffo et al., 2018). In natural conditions, these observations may be associated with the sandfly's eclectic eating behavior, displaying no food preference, and their ability to take a blood meal on any available vertebrate animal, including man (Guimarães-Silva et al., 2017; Diniz et al., 2014; Oliveira et al., 2008; Zijlstra, 2014).

Although PBF was high, half of the engorged females died before taking a second feeding, with a 54% mortality rate. This result may be related to the gonotrophic concordant cycle that characterizes most females; that is, they feed once, reproduce, and die. In addition,

we observed that some females had a distended abdomen due to a large number of eggs. According to some authors, many matured eggs can cause stress and exhaustion, culminating in the death of these females (Killick-Kendrick; Rioux, 2002).

Another hypothesis explaining the high mortality rates may be related to infection by *L. amazonensis*. Studies demonstrated that *Leishmania* infection of sandflies could also affect longevity and fecundity (Agrela & Feliciangeli, 2015). Some authors suggested that this occurs due to lesions in the phlebotomine stomodeal valve induced by the chitinase produced by *Leishmania* (Tolezano et al., 2007; Warburg et al., 1994). The stress of the infection itself possibly reduces the longevity of infected sandflies (Rogers & Bates, 2007).

The female *L. longipalpis*, in addition to presenting high rates of feeding, also presented high rates of infection by *L. amazonensis* (53%). This demonstrates the high permissiveness of this species, which translates into the ability of this vector to sustain infection by *L. amazonensis*. This high rate of infection can be explained by the degree of cutaneous parasitism in the mouse because these animals were exposed to insects only after the appearance of leishmaniotic lesions (45 days after infection), increasing the chances of the capture of the parasite by the sandflies (Diniz et al., 2014).

Transmission studies are challenging because of the high mortality rate of insects after the first blood meal, with few specimens remaining to perform the second feeding (Oliveira et al., 2017). However, the high infection rates increased the chance of obtaining infected females surviving the first feeding. Another factor that implies successful transmission is the state of the vertebrate host's immune system (Akuffo et al., 2018). Thus, the induction of immunosuppression in mice increased the likelihood of infection, even with the small number of infected females available for the second blood meal.

The transmission of the parasite to a healthy animal might have been successful by observing clinical manifestations of the disease 27 days after the second blood meal by the females that had previously fed on infected animals. Immunosuppression may have been a factor that facilitated transmission; however, Animal A was also subjected to immunosuppression and did not show clinical signs of CL. In addition, Animal B was subjected twice (groups XI and XII) to a second blood-feeding, increasing the likelihood of successful transmission. We confirm that three out five females used in these groups were positive for the parasite by dissection and DNA detection.

Our results demonstrate the transmission of *L. amazonensis* to an immunosuppressed Balb/c mouse through the bite of *L. longipalpis*, followed by cutaneous lesions in less than a month. This conclusion is supported by the fact that the healthy (and immunosuppressed) mouse developed the infection after exposure to insects previously fed by infected mice. We confirmed that the same parasite was present in both insects and mouse lesions through the phylogeny of the *ITS-1* gene. Moreover, the animal developed the disease in the paws, snout, and internal organs (spleen, liver, and inguinal lymph nodes), which is less common in CL. Noteworthy that studies showed that immunosuppressed patients, such as those infected with the human immunodeficiency virus, have an increased risk of severe and widespread CL (Soares et al., 2020). Patients infected with dermatropic *Leishmania* also developed a visceral form (Zijlstra, 2014).

We highlight a study (Sherlock, 1996), in which was suggested the transmission of *L. amazonensis* to healthy (and immunocompetent) hamsters by the bite of *L. longipalpis*. However, the hamster manifested only clinical signs of VL after three months, caused by *L. infantum*. Perhaps it was not *L. amazonensis* but *L. infantum* (a common mistake at that time when molecular tests were not being carried out). These results differed from our study, in which the mouse developed skin lesions in less than one month, a clinical manifestation characteristic of *L. amazonensis*. Other cases of VL attributed to *L. amazonensis* have been reported in humans (Barral et al., 1991) and dogs (Tolezano et al., 2007). These authors attributed the visceral tropism to the saliva of *L. longipalpis* sibling species, which differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis (Warburg et al., 1994). Genetic variation of *L. amazonensis* strains has also been related to the parasite tropism (Oliveira et al., 2007).

Interestingly, *L. longipalpis* in an endemic area for CL was reported in central Colombia, without any case of VL having been reported (López et al., 1996). Another study carried out in a community of Panama, where the environment underwent urbanization, presenting areas degraded by deforestation, also reported *L. longipalpis* in an area endemic to CL (Valderrama et al., 2011). Studies have also cited rodents (Caldart et al., 2017) and dogs (Dias et al., 2011) naturally infected by *L. amazonensis* in Brazil.

Considering that the natural vector of *L. amazonensis* is primarily wild, we reinforce that it can be replaced by another abundant species in the urban area, in this case, *L. longipalpis*, which may behave as a secondary vector of this parasite. Our study suggests that the *L.*

amazonensis has completed its development to the metacyclic forms in *L. longipalpis*, reinforcing its competence as a vector for *L. amazonensis*.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA/number 00967-17) and by Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) for providing scholarship for R. C. Ribeiro-da-Silva. We are thankful to Dr. Maurício Roberto Viana Sant’Anna, from the Parasitology Laboratory of the Federal University of Minas Gerais for providing *L. amazonensis* (IFLA/BR/1968/PH8).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization, R.C.R.S., S.R.F.P. and J.M.M.R.; project administration and funding acquisition, J.M.M.R. and S.R.F.P.; Sample collection and methodology, R.C.R.S., L.N.P.D.C., J.M.S.C. and C.E.F.A.; formal analysis, R.C.R.S., S.R.F.P. and J.M.M.R.; writing—original draft preparation, R.C.R.S., S.R.F.P. and J.M.M.R.; writing—review and editing, R.C.R.S. and S.R.F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Agrela, I.F. & Feliciangeli M.D. (2015) Effect of *Leishmania* spp infection on the survival, life expectancy, fecundity and fertility of *Lutzomyia longipalpis* s.l. and *Lutzomyia pseudolongipalpis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **110**, 611–617.
- Alexandre, J., Sadlova, J., Lestinova, T., Vojtkova, B., Jancarova, M., Podesvova, L., Yurchenko, V.V., Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., Volf, P. (2020) Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*, **10**, 3566.
- Akuffo, H., Costa, C., van Griensven J., Burza S., Moreno, J. & Herrero, M. (2018) New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **12**, 1–16.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro De Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M. & Johnson W.D. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **44**, 536–546.

- Brasil. (2019) Guide to Health Surveillance. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (ed. by Ministério da Saúde), 740p. Ministério da Saúde, Brasília. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. (accessed 10 October 2020).
- Caldart, E.T., Freire, R.L., Ferreira, F.P., Ruffolo, B.B., Mareze, M. & Navarro, I.T. (2017) *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 2961: 17–27.
- Carneiro, F.R.O., Amin, G.A., Cruz, L.B.P. & Daher, B.A. (2018) Urban American cutaneous leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **93**, 156–158.
- Castelo-Branco, P.V., Alves, H.J., Pontes, R.L., Maciel-Silva, V.L. & Ferreira Pereira, S.R. (2019) Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* without decreasing its antileishmanial activity. *International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance*, **9**, 8–15.
- Cecílio, P., Pires, A.C.A.M., Valenzuela, J.G., Pimenta, P.F.P., Cordeiro-da-Silva, A., Secundino, N.F.C. & Oliveira, F. (2020) Exploring *Lutzomyia longipalpis* sand flies vector competence to *Leishmania major* parasites. *Jornal Infectious Diseases*, **222**, 1199–1203.
- Coelho, M.V. & Falcão, A.R. (1962). Transmissão de *Leishmania braziliensis*. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **4**, 220–224.
- Dias, E.S., Regina-Silva, S., França-Silva, J.C., Paz, G.F., Michalsky, É. M., Araújo, S.C., Valadão, J.L., Lara-Silva, F.O., de Oliveira, F.S., Pacheco, R.S. & Fortes-Dias, C.L. (2011) Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **176**, 101–111.
- Diniz, M.M.C.D.S.L., Galvis Ovallos, F., De Castro Gomes, C.M., De Oliveira Lavitschka, C. & Galati, E.A. (2014) Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasites and Vector*, **7**, 1–11.
- Guimarães-E-Silva, A.S., De Oliveira Silva S., Ribeiro-Da-Silva, R.C., Pinheiro, V.C. S., Rebêlo, J.M.M. & Melo, M.N. (2017) *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLoS One*. **12**, 1–19.
- Hafeez, B.B., Ahmad, I., Haque, R. & Raisuddin, S. (2001) Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **75**, 13–18.
- De Jesus Pereira, N.C., Régis, W.C.B., Costa, L.E., de Oliveira, J.S., da Silva, A.G., Martins, V.T., Duarte, M.C., de Souza, J.R.R., Lage, P.S., Schneider, Mô.S., Melo, M.N., Soto, M., Soares, S.A., Tavares, C.A.P., Chávez-Fumagalli, M.A. & Coelho, E.A.F. (2015) Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, **153**, 180–190.
- Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. (2017). Histologia básica: texto e atlas. (13 ed. by A. Koogan Guanabara), 556p. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- Killick-Kendrick, R. & Rioux, J.A. (2002). Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*, **44** (1-2), 67-71.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1547–1549.
- López, Y., Osorio, L., Alvarez, G., Rojas, J., Jiménez, F., Gómez, C. & Ferro, C. (1996) Sandfly *Lutzomyia longipalpis* in a cutaneous leishmaniasis focus in Central Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **91**, 415–419.
- Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P.D., Barazarte, R., Travi, B.L. & Lane, R.P. (2003) Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, **85**, 19–29.
- Oliveira, A.G., Marassá, A.M., Consales, C.A., Dorval, M.E.C., Fernandes, C.E., de Oliveira, G.R., Brazil, R.P. & Galati, E.A.B. (2008) Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Tropica*, **107**, 238–241.
- Oliveira, E.F., Oshiro, E.T., Fernandes, W.S., Murat, P.G., de Medeiros, M.J., Souza, A.I., Alessandra, G.O. & Galati, E.A.B. (2017) Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **11**, 1–23.
- Oliveira, J.P., Fernandes, F., Cruz, A.K., Trombela, V., Monteiro, E., Camargo, A.A., Barral, A. & de Oliveira, C.I. (2007) Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease*, **6**, 1–8.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Nascimento, J.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Junior, H.F.A. & Malafrente, R.S. (2006) Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, **99**, 252–259.
- Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J. & Sacks, D.L. (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 9155–9159.
- Ribeiro-da-Silva, R.C., Cruz, L.N.P.D., Coutinho, J.M.S., Santana, N.C.C. & Rebêlo, J.M.M. (2021) Maintenance and productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) colony from an area endemic for visceral and cutaneous leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **XX** (XX) 1-9.
- Ribeiro-da-Silva, R.C., Guimarães-e-Silva, A.S., Sousa, S.S.S., Bezerra, J.M.T., Rebêlo, J.M.M. & Pinheiro, V.C.S. (2019) Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban Leishmaniasis Transmission Foci in North-Eastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **56**, 247–253.

- Rodrigues, O.R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M.H. & Santos-Gomes, G.M. (2009) Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology*, **214**, 101–111.
- Rogers, M.E. & Bates, P.A. (2007) *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, **3**, 0818–0825.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A.J. & Bates, P.A. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, **430**, 463–467.
- Sant’Anna, M.R.V., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W.S., Cavalcante, R.R., Dillon, V.M., Bates, P.A., Genta, F.A. & Dillon, R.J. (2014) Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & Vectors*, **7**, 1–10.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W. & Jaffe, C.L. (2003) PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **47**, 349–358.
- Sherlock, I. A. (1996) Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **91**, 671–683.
- Soares, G.H.C., da Silva, A.B.S., de Sousa Ferreira, L.S., Ithamar, J.S., de Alencar Medeiros, G., Pereira, S.R.F., Lima, M.I.S. & Azevedo, C.M.P.S. (2020) Case report: Coinfection by *Leishmania amazonensis* and HIV in a Brazilian diffuse cutaneous leishmaniasis patient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**, 1076–1080.
- Tafuri, W.L., Santos, R.D.L., Arantes, R.M.E., Gonçalves, R., De Melo, M.N., Michalick, M.S.M. & Tafuri, W.L. (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, **292**, 17–23.
- Tolezano, J.E., Uliana, S.R.B., Taniguchi, H.H., Araújo, M.F.L., Barbosa, J.A.R., Barbosa, J.E.R., Floeter-Winter, L.M. & Shaw, J.J. (2007) The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **149**, 280–284.
- Valderrama, A., Tavares, M.G. & Filho, J.D.A. (2011) Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**, 1049–1051.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J. & Votypka, J. (2004) Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, **34**, 1221–1227.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G. & Neva, F. (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **345**, 223–230.
- Zijlstra, E.E. (2014) PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLOS*

Neglected Tropical Diseases, **8**, e3258.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Ilha do Maranhão, por ser uma área onde as leishmanioses manifestam-se endemicamente, requer atenção constante e contínua para com o ciclo de transmissão de *Leishmania*. Neste contexto, a continuação do monitoramento entomológico de *Lu. longipalpis* na região, detecção molecular de DNA de espécies de *Leishmania* no conteúdo estomacal dessa espécie de flebotomíneos e ensaios de transmissão experimental dos parasitos acarretam em maiores contribuições à compreensão da natureza desta parasitose e em medidas de prevenção mais eficientes. No Maranhão, vários trabalhos demonstram a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* em se infectar com as espécies de *Leishmania* que causam LVA e LTA. No entanto, ainda não dispomos de dados na literatura de estudos *in vivo* de competência vetorial, que comprovam a transmissão *Le. amazonensis* pela picada deste flebotomíneos na região do presente estudo.

Este estudo demonstra que a espécie *Lu. longipalpis* tem competência, em condições experimentais, para transmitir *Le. amazonensis*. É importante ressaltar, que não estamos incriminando *Lu. longipalpis* como vetor principal. Mesmo assim, nossos dados dão relevância ao *Lu. longipalpis* como um possível vetor secundário desse parasito, uma vez que este taxon é bem adaptado em ambiente modificado pelo homem, onde *Le. amazonensis* está presente e o seu vetor natural, *Brichromomyia flaviscutellata*, não tem sido encontrado, pelo menos, com muita frequência.

Apesar da imunossupressão do animal, a doença manifestou-se inicialmente sob a forma cutânea como um edema discreto no membro superior direito. Apesar de a condição de imunossupressão não ocorrer com frequência em condições naturais, a manifestação clínica da doença no camundongo demonstra que o parasito completou seu desenvolvimento até as formas metacíclicas (forma infectante) na *Lu. longipalpis*, uma vez que houve a transmissão. Isso mostra que esse flebotomíneo é um vetor competente para esse parasito em locais e regiões em que ambos circulam. Além disso, este estudo, pretende auxiliar com os órgãos de saúde pública para medidas de prevenção desta doença, em especial as pessoas imunossuprimidas que são mais vulneráveis a esses parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULRAHMAN YI, GARMSON JC, MOLYNEUX DH, BATES PA. Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 421-425
- AGUIAR GM, MEDEIROS WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In.: Flebotomíneos do Brasil, a Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003; 207-255
- AKUFFO H, COSTA C, GRIENSVEN J, BURZA S, MORENO J, HERRERO M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(5): e0006375
- ALEXANDER B, MUTEBI JP, HEARNE D, LANZARO GC, WARD RD, HAMILTON JGC. Current status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998; 93: 31-33
- ALVAR J, APARICIO P, ASEFFA A, DEN BOER M, CAÑAVATE C, DEDET J, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(2): 334-359
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7(5): e35671
- ARAÚJO JC, REBÊLO JMM, CARVALHO ML, BARROS VLL. Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município da Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomología y Vectores, 2000; 7 (1): 33-47
- ARIAS JR, MILES MA, NAIFF RD, POVOA MM, FREITAS RA, BIANCARDI CB, CASTELLON EG. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1985; 34 (6): 1098-1108
- ARRIVILLAGA JC, FELICIANGELI MD. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. J Med Entomol, 2001; 38: 783-790
- BARATA RA, FRANÇA-SILVA JC, MAYRINK W, SILVA JC, PRATA A, LOROSA ES, FIUZA JÁ, GONÇALVES CM, PAULA KM, DIAS ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop, 2005; 38 n.5, p. 421-425
- BARRAL A, BADARÓ R, BARRAL NETTO M, GRIMALDI JR G, MOMEN H, CARVALHO EM. Isolation of *Leishmania amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. Amer J Trop Med Hyg 1986; 35: 732-734
- BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, GRIMALDI G JR, MOMEN H, MCMAHON-PRATT D, JESUS AR, et al. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 1991; 44(5): 536-546

- BARROS VLL, REBÊLO JMM, SILVA FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira no município do Paço do Lumiar, estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Caderno de Saúde Pública, 2000; 16: 265-270
- BAUZER LGSR, SOUZA NA, MAINGON RDC, PEIXOTO AA. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: A Complex or a Single Species? A Mini-Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2007; 102 (1): 1–12
- BORATYN GM, CAMACHO C, COOPER PS, COULOURIS G, FONG A, MA N, MADDEN TL, MATTEN WT, MCGINNIS SD, MEREZHUK Y, RAYTSELIS Y, SAYERS EW, TAO T, YE J, ZARETSKAYA I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. Nucleic Acids Res. 2013; 41: 29–33
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV / Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 1. ed., rev. e ampl. – Brasília :Ministério da Saúde, 2015. 109p
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014
- BRAZIL PP, BRAZIL BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In.: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Eds.), Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003; 257-274
- BRAZIL RP, CARNEIRO VL, ANDRADE FILHO JD, ALVES JCM, FALCÃO AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 1997; 26: 191-193
- BRAZIL RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. Rev Soc Bras Med Trop., 2013; 46 (3): 263-4
- BUESCHER MD, RUTLEDGE LC, ROBERTS J, NELSON JH. Observations on multiple feeding by *Lutzomyia longipalpis* in the laboratory. Mosquito News, 1984; 44: 76-77
- CARDOSO L, CABRAL M. *Leishmania* e leishmaniose canina. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 1998; 527: 121-141
- CARVALHO ML, REBÊLO JMM, ARAÚJO JC, BARROS VLL. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Entomologia y Vectores, 2000; 7: 19–32

- CASANOVA C, COLLA-JACQUES FE, HAMILTON JGC, BRAZIL RP, SHAW JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015; 9 (3): 1 – 14
- CASTELO-BRANCO PV, ALVES HJ, PONTES RL, MACIEL-SILVA VL, PEREIRA SRF. Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* without decreasing its antileishmanial activity. IJP: Drugs and Drug Resistance, 2019; 9: 8–15
- CECÍLIO P, PIRES ACAM, VALENZUELA JG, PIMENTA PFP, CORDEIRO-DA-SILVA A, SECUNDINO NFC, OLIVEIRA F. Exploring *Lutzomyia longipalpis* sand flies vector competence to *Leishmania* major parasites. J. Infect. Dis. 2020; 222: 1199–1203
- COELHO MV, FALCÃO AR, FALCÃO AL. Development of species of the genus *Leishmania* in Brazilian species of sandflies of the genus *Lutzomyia* Franca, 1924. II. Life cycle of *L. tropica* in *L. longipalpis* and *L. renei*. Rev Inst Med Trop., São Paulo, 1967; 9: 192-196
- COELHO MV, FALCÃO AR. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II-Transmissão de amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* e *Phlebotomus renei*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1962; 4: 220-224
- COMER JA, KAVANAUGH DM, STALLKNECHT DE, CORN JL. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. J. Med., Entomol., 1994; 31: 850-854
- CONCEIÇÃO-SILVA F, ALVES CR. Leishmanioses do continente americano. In: Leishmanioses do continente americano. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014: 512
- COSTA JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gazeta Médica da Bahia, 2005; 75: 3-17
- JESUS PEREIRA NC, RÉGIS WCB, COSTA LE, DE OLIVEIRA JS, DA SILVA AG, MARTINS VT, DUARTE MC, DE SOUZA JRR, LAGE PS, SCHNEIDER MS, MELO MN, SOTO M, SOARES SA, TAVARES CAP, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, COELHO EAF. Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. Exp. Parasitol, 2015; 153: 180–190
- DE SOUZA MA, SABROZA PC, MARZOCHI M, COUTINHO SG, DE SOUZA WJS. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1-Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1981; 76: 161–168
- DEANE LM, DEANE MP. Observações preliminares sobre a importância comparative do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em áreas de calazar no Ceará. O Hospital, 1955; 48: 61-67
- DEANE LM, DEANE MP. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no Nordeste do Estado do Ceará. Revta. Brasil. Malar. Doenç. Trop., 1957; 9(2): 225- 246
- DIAS ES, FRANCA-SILVA JC, SILVA JC, MONTEIRO EM, PAULA KM, GONCALVES CM, BARATA RA. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis

- in the State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007; 40 (1): 49–52
- DIAS ES. Psychodidae. In.: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*. Atheneu. 12ed. 2011: 377-85
- DIAS FO, LOROSA ES, REBÊLO JM. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saude Publica*, 2003; 19(5): 1373-1380
- DIAS, E.S., C.L. FORTES-DIAS, J.M. STITELER, P.V. PERKINS; P.G. LAWYER. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 40: 49-53. 1998.
- DINIZ MMCSL, GALVIS OVALLOS F, DE CASTRO GOMES CM, DE OLIVEIRA LAVITSCHKA C, GALATI EAB. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasites and Vectors*. 2014; 7: 1–11
- DUJARDIN JC, CAMPINO L, CAÑAVATE C, DEDET JP, GRADONI L, SOTERIA DOU K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(7): 1013-1018
- DUJARDIN JP, TORREZ EM, LE PONT F, HERVAS D, SOSSA D. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med Vet Entomol*, 1997; 11: 394-400
- FALQUETO A, COURA JR, BARROS GC, GRIMALDI FILHO G, SESSA PA, CARIAS VR, JESUS AC, ALENCAR JTA. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1986; 81(2): 155-63
- FALQUETO A, VAREJAO JB, SESSA PA. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987; 82(3): 443
- FELSENSTEIN J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y). 1985; 39: 783
- FERRO C, CARDENAS E, CORREDOR D, MORALES A, MUNSTERMANN LE. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1998; 93(2): 195-199
- FERRO C, PARDO R, TORRES M, MORRISON AC. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*, 1997; 34: 719-728
- FILHO AAP, BANDEIRA MCA, FONTELES RS, MORAES JLP, LOPES CRG, MELO MN, REBÊLO JMM. An ecological study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the vicinity of Lençóis Maranhenses National Park, Maranhão, Brazil. *Parasites & Vectors*, 2015; 8(442): 1-8
- FONTELES RS, PEREIRA FILHO AA, MORAES JLP, PEREIRA SRF, RODRIGUES BL, REBÊLO JMM. Detection of *Leishmania* DNA and Blood Meal Identification in Sand Flies

(Diptera: Psychodidae) From Lençóis Maranhenses National Park Region, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 2018; 55(2): 445–451

FORATTINI OP. *Entomologia Médica*. São Paulo: Editora Blucher. Editora da Universidade de São Paulo, 1973: 658

GALATI EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de flebotomíneos. In.: *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; 2003. 266p

GALATI EAB, NUNES VLB, BOGGIANI PC, DORVAL MEC, CRISTALDO C, ROCHA HC. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2003; 47(2): 283-296

GALATI EAB, NUNES VLB, REGO JRFA, OSHIRO ET, CHANG M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 1997; 31(4): 378-390

GAMA MEA, BARBOSA JS, PIRES B, CUNHA AKB, FREITAS AL, RIBEIRO IR, COSTA JML. Avaliação do nível de conhecimento que a população residente em área endêmicas periurbana e rural, têm sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 1998; 14:109-118

GARRET-JONES, C. The human blood index of malária vectors in relations to epidemiological assessment. *Bulletin of the World Health Organization*, 1964; 30(2): 241-261

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004; 7:338-49

GONTIJO CMF, MELO MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2004; 7: 338-349

GONTIJO NF, ALMEIDA-SILVA S, COSTA FF, MARES-GUIA ML, WILLIAMS P, MELO MN. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive, Glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* Development. *Exp Parasitol*, 1998; 90:212-9

GRIMALDI GJR, TESH RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 1993; 6: 230-250

GUIMARÃES-E-SILVA AS, LEONARDO FS, COSTA ERS, ALCÂNTARA SH, PINHEIRO VCS, REBÊLO JMM. The Occurrence of Flebotomines (Diptera psychodae) in a Leishmaniasis-Endemic Area. *Revista Paraense de Medicina*, 2012; 26(2): 23-28

GUIMARÃES-E-SILVA AS, SILVA, SO, RIBEIRO-DA-SILVA RC, PINHEIRO VCS, REBÊLO JMM, MELO MN. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. *PLoS One*, 2017; 12: 1–19

HAFEEZ, B. B., AHMAD I., HAQUE R., RAISUDDIN S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *J. Ethnopharmacol*. 75: 13–18. 2001.

- HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford Univ. Press. 1999; 95–98
- HAMILTON JG, RAMSOONDAR TM. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Med Vet Entomol*, 1994; 8(4): 375-80
- HAMILTON JGC, WARD RD, DOUGHERTY MJ, MAIGNON R, PONCE C, PONCE E, NOYES H, ZELEDON R. Comparison of the sex-pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Costa Rica. *Ann Trop Med Parasitol*, 1996; 90: 533-541
- HANSON, W. J. The breeding places of *Phlebotomms* in Panama (Diptera, Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 1961; 54: 317-322
- HOLCMAN MM, SAMPAIO SMP, RANGEL O, CASANOVA C. Spatial and seasonal 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2013; 46(6): 704-712
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Censo. Populacional. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/raposa/panorama>>, acesso em 15 jan. 2019
- JARVIS EK, RUTLEDGE LC. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 1992; 29(2): 171-7
- JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2017; 554p
- KATO H, GOMEZ EA, CACERES AG, UEZATO H, MIMORI T, HASHIGUCHI Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *J. Environ. Res. Public Health*, 2010; 7(3): 814-826
- KILLICK-KENDRICK M, KILLICK-KENDRICK R. The initial establishment of sand fly colonies. *Parassitologia*, 1991; 33: 315-320
- KILLICK-KENDRICK R, LEANEY AJ, READY PD. A laboratory culture of *Lutzomyia longipalpis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1973; 67: 434
- KILLICK-KENDRICK R, LEANEY AJ, READY PD. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 1977; 13: 429-440
- KILLICK-KENDRICK R, LEANEY AJ, READY PD, MOLYNEUX DH. *Leishmania* in phlebotomid sandflies IV. The Transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *The Royal Society*, 1977; 196: 105 - 115
- KILLICK-KENDRICK R, WARD, DH. Transmition of leishmaniosis by the bait of phlebotomine sandfly: possible mechanism. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, [S.l.], 1981; 75(1): 152-154
- KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, 1990; 4(1): 1-24

- KILLICK-KENDRICK R. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. *Acta. Trop.*, 1978; 35: 297-313
- KILLICK-KENDRICK R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol*, 1999; 17: 279-289
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16: 111–120
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–1549
- LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005; 100(8): 811-27
- LAINSON R, SHAW JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, 1978; 273: 596-600
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, 1987: 1-120
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, 1987; 1-121
- LAINSON R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2010; 1(2): 13-32
- LAINSON R., DYE C, SHAW JJ, MACDONALD DW, COURTENAY O, SOUZA SFT. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1990; 85 (1): 135-137
- LANA RS, MICHALSKY ÉM, FORTES-DIAS CL, FRANÇA-SILVA JC, LARA-SILVA FO, LIMA ACVMR, AVELAR DM, MARTINS JCD, DIAS ES. Phlebotomine Sand Fly Fauna and *Leishmania* Infection in the Vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. *BioMed Research International*, 2015; 2015: 1-19
- LANZARO G, OSTROVSKA K, HERRERO M, LAWYER P, WARBURG A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg*, 1993; 48: 839-847
- LARA-SILVA FO, MICHALSKY ÉM, FORTESDIAS CL, FIUZA VDEO, PESSANHA JE, REGINA-SILVA S, AVELAR DM, SILVA MA, LIMA AC, COSTA AJ, MACHADO-COELHO GL, DIAS ES. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 2015; 148: 128-36
- LAWYER P, KILLICK-KENDRICK M, ROWLAND T, ROWTON E, VOLF P. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) TT -

- Établissement de colonies de laboratoire et élevage de masse des phlébotomes (Diptera, Psychodidae). *Parasite*. 2017. 24: 42
- LAWYER PG, NGUMBI PM, ANJILI CO, ODONGO SO, MEBRAHTU YB, GITHURE JI, KOECH DK, ROBERTS CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*, 1990; 43(1): 31-43
- LEONARDO FS, REBÊLO JMM. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2004; 37(3): 282-284
- LESSA MM, LESSA HÁ, CASTRO TWN, OLIVEIRA A, SCHERIFER A, MACHADO P, CARVALHO EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 2007; 73(6): 843-847
- LÓPEZ Y; OSORIO L, ALVAREZ G, ROJAS J, JIMÉNEZ F, GÓMEZ C, FERRO C. Sandfly *Lutzomyia longipalpis* in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Central Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1996; 91(4): 415-419
- MACEDO ITF, BEVILAQUA CML, MORAIS NB, SOUSA LC, LINHARES FE, AMÓRA SSA, OLIVEIRA LMB. Sazonalidade de Flebotomíneos em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral no Município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal*, 2008; 18(2): 67-74
- MANGABEIRA O. Sobre a sistemática e biologia do *Phlebotomus* no Ceará. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 1969; 21: 3-26
- MARCONDES CB. Entomologia Médica e Veterinária. In.: Cap. 5. Flebotomíneos. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011
- MARSELLA R, GOPEGUI RR. Leishmaniasis: a reemerging zoonosis. *International Journal of Dermatology*, 1998; 37: 801-814
- MARTINS AMCB, REBÊLO JMM. Dinâmica espaço-temporal de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do município de Santa Quitéria, área de cerrado do Estado do Maranhão, Brasil. *Iheringia Série Zoologia*, 2006; 96(3): 283-288
- MARTINS VT, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, LAGE DP, DUARTE MC, GARDE E, COSTA LE, DA SILVA VG, OLIVEIRA JS, DE MAGALHÃES-SOARES DF, TEIXEIRA SMR, FERNANDES AP, SOTO M, TAVARES CAP, COELHO EAF. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2015; 10: 1–25
- 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). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2002; 44(5): 255-9
- MODI GB, TESH RB. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol*, 1983; 20: 568-569

- MODI GB. Care and maintenance of phlebotominae sandfly colonies. in: Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis C. (Eds.), *Molecular Biology of Insect Disease Vectors*. Chapman and Hall, London, 1997: 21-30
- MOLYNEUX DH, KILLICK-KENDRICK R, ASHFORD RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1975; 190: 341-357
- MONTEIRO CC. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte. 71f., 2012
- MORALES A, BELLO F, CARDENAS E. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Revista Ciencias de La Salud*, Bogotá, 2005; 3(2): 129-135
- MUKHOPADHYAY J, GHOSH K, AZEVEDO AC, RANGEL EF, MUNSTERMANN LE. Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Am Mosq Control Assoc*, 1998; 14: 277-82
- MYSKOVA J, SVOBODOVA M, BEVERLEY SM, VOLF PA lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sandflies. *Microbes and Infection*, 2007; 9(3): 317-324
- NASCIMENTO MDSB, SILVA MH, VIANA GMC, LEONARDO FS, BEZERRA GFB, GUIMARÃES-E-SILVA AS, SOARES VCP, PEREIRA SRF, REBÊLO JMM, BRAZIL RP. Spatial dynamics of urban populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Caxias, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, 2013; 46(5): 555-559
- NIEVES E, PIMENTA PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 2000; 37(1): 134-40
- NIGAN Y, WARD RD. The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiol Entomol*. 1991; 16(3): 305-12
- NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005
- OLIVEIRA EF, OSHIRO ET, FERNANDES WS, MURAT PG, MEDEIROS MJ, SOUZA AI., ALESSANDRA GO, GALATI EAB. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: 1–23
- OLIVEIRA EF, FERNANDES CES, SILVA EA, BRAZIL RP, OLIVEIRA AG. Climatic Factors and Population Density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in an Urban

Endemic Area of Visceral Leishmaniasis in Midwest Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 2013; 38(2): 224-228

OLIVEIRA FJA, COSTA IC, NUNES V, O. OLIVEIRA, B.P. OLIVEIRA NETO AND J.E. OLIVEIRA. Leishmaniose tegumentar americana: Flebotomíneos de área de transmissão do Parque Arthur Thomas na região de Londrina – PR. *Biosaúde*, 2000; 2: 81-87

OLIVEIRA JPC, FERNANDES F, CRUZ AK, TROMBELA V, MONTEIRO E, CAMARGO AA, et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetop Biol Dis.* 2007; 6: 5

OLIVEIRA MC, AMORIM RFB, FREITAS RA, COSTA ALL. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 258-260

OPS – Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS, 2019

OSHAGHI MA, MCCALL PJ, WARD RD. Response of adult sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), to sticky traps baited with host odour and tested in the laboratory. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994; 88(4): 439-44

PAHO - Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C.: PAHO; 2019

PAIVA BR, OLIVEIRA AG, DORVAL MEMC, GALATI EAB, MALAFRONTA RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Tropica*, 2010; 115: 126-130

PAIVA BR, SECUNDINO NFC, NASCIMENTO JC, PIMENTA PFP, GALATI EAB, ANDRADE-JUNIOR HF, MALAFRONTA RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, 2006; 99: 252-259

PENHA TA, SANTOS ACG, REBÊLO JMM, MORAES JLP, GUERRA RMSNC. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Luís - MA, Brasil. *Revista Biotemas*, 2013; 26(2): 121-127

PEREIRA FILHO AA, BANDEIRA MCA, FONTELES RS, MORAES JLP, LOPES CRG, MELO MN, REBÊLO JMM. An ecological study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the vicinity of Lençóis Maranhenses National Park, Maranhão, Brazil. *Parasites & Vectors*, 2015; 8(442): 1-8

PIMENTA PF, TURCO SJ, McCONVILLE MJ, LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V.; SACKS, D.L., Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256: 1812-1815. 1992.

PIMENTA PFP, FREITAS VC, SECUNDINO NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In.: *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT*, 2012; capítulo 12

- PIMENTA PFP, MODI GB, PEREIRA ST, SHAHABUDDIN M SACKS D. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolitic activities of the sandfly midgut. *Parasitol.* 1997; 115: 359-369.
- PIMENTA PFP. SECUNDINO NFC, BLANCO EEN. Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado In.: Rangel, E.F., Laison, R. editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, 2003; 275-289
- PINTO MC, CAMPBELL-LENDRUM DH, LOZOVEI AL, TEODORO U, DAVIES CR. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol.*, 2001; 15(2): 132-9
- QUINNELL RJ, DYE C. An Experimental-Study of the Peridomestic Distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 1994; 84(3): 379-82
- RANGEL EF, AZEVEDO AC, ANDRADE CA, SOUZA NA, WERMELINGER ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1990; 85(1): 39-45
- RANGEL EF, BARBOSA AF, ANDRADE CA, SOUSA NA, WERMELINGER ED. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992; 87(2): 235-8
- RANGEL EF, LAINSON R. *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, 2003. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003. 368p
- RANGEL EF, LAINSON R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2009; 104 (7): 937-954
- RANGEL EF, LAINSON R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2009; 104(7): 937-954
- RANGEL EF, SHAW JJ. *Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control*. Springer, 2018; 1ªed: 514p
- READY PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 58:227–2013
- READY PD. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 1979; 16: 413-423
- READY PD. The feeding habits of laboratory bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 1978; 14: 545-552
- REBÊLO JMM, ARAÚJO JAC, CARVALHO ML, BARROS VLL, SILVA FS, OLIVEIRA ST. Flebotomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1999; 32(3): 247-253

REBÊLO JMM, ROCHA RV, MORAES JLP, SILVA CRM, LEONARDO FS, ALVES GA. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 2010; 54: 494-500

REBÊLO JMM. Flebótomos vetores das leishmanioses. Manual para técnicos e profissionais da área de saúde. Estações Produções. São Luís, 1997.32p

REBÊLO JMM. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2001; 17(1): 221-227

REISEN W. K. Estimation of vectorial capacity: relationship to disease transmission by malária and arbovirus vectors. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 14, n. 1: 67-70, 1989

RESENDE MC, CAMARGO MCV, VIEIRA JRM, NOBI RCA, PORTO MN, OLIVEIRA CDL, PESSANHA JE, CUNHA MCM, BRANDAO ST. Seasonal Variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006; 39(1): 51-55

RIBEIRO ALM, MISSAWA NA. Spatial distribution of phlebotominae species in the state of Mato Grosso, Brazil, in the period of 1996 to 2001. *Entomologia y Vectores*, 2002; 9: 33-34

RIBEIRO-DA-SILVA RC, GUIMARÃES-E-SILVA AS, SOUSA SSS, BEZERRA JMT, REBÊLO JMM, PINHEIRO VCS. Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban Leishmaniasis Transmission Foci in North-Eastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 2019; 56(1): 247-253

RODRIGUES, O.S.; MARQUES, C.; SOARES-CLEMENTE, M.; FERRONHA, M.H.; SANTOS-GOMES, G.M. Identification of regulatory T cells during Experimental *Leishmania infantum* infection. *Immun*, 2009; 101-111

ROGERS ME, CHANCE ML, BATES PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania Mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 2002; 124: 495-507

ROGERS ME, ILG T, NIKOLAEV AV, FERGUSON MAJ, BATES PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 2004; 430: 463-467

ROSS R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J* 1903; 2:1261-2

SACKS D, KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001; 55: 453-483

SACKS DL, KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 2001; 55: 453-83

SACKS DL, PERKINS PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985; 34(3): 456-9

SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4: 406-425

- SALES NMC, JUNIOR ASS, MACHADO TO. Antropização x Circulação Enzoótica de *Leishmania* spp. em duas Áreas de uma Capital Brasileira Planejada: Palmas. In.: VI Jornada de Iniciação Científica e Extensão. Instituto Federal de Tocantins. 2015. Tocantins. Artigo publicado em anais. 2015; p. 1-7
- SALOMÓN OD, BASMAJDIAN Y, FERNÁNDEZ MS, SANTINI MS. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2011; 106: 381–382
- SAMPAIO RNR, SALARO CP, RESENDE P, PAULA CDR. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002; 35(6): 651-654
- SANTINI MS, FERNÁNDEZ MS, CAVIA R, SALOMÓN OD. Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. Medical and Veterinary Entomology. 2017; 32: 10.1111/mve.12283
- SANTOS SO; ARIAS J; RIBEIRO AA; HOFFMAN MP; FREITAS RA; MALACCO MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology. 1998; 12: 315–317
- SARAIVA L, LEITE CG, LIMA ACVMR, CARVALHO LOA, PEREIRA AAS, RUGANI JMN, REGO FD, GONTIJO CMF, FILHO JDA. Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017; 112(4): 309-318
- SCHLEIN Y, WARBURG A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. J Med Entomol. 1986; 23(1): 11-5
- SCHONIAN G, NASEREDDIN A, DINSE N, SCHWEYNOCH C, SCHALLIG HDFH, PRESBER W, JAFFE CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2003; 47, p. 349-358
- SECUNDINO N, KIMBLIN N, PETERS NC, LAWYER P, CAPUL AA, BEVERLEY SM, TURCO SJ, SACKS D. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania (L.) major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. Cell Microbiol, 2010; 12(7): 906-18
- SECUNDINO NF, EGER-MANGRICH I, BRAGA EM, SANTORO MM, PIMENTA PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J. Med. Entomol, 2005; 42(6): 928-938
- SECUNDINO NFC, FREITAS VC, MONTEIRO CC, PIRES ACAM, DAVID BA, PIMENTA PFP. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. Parasites & Vectors, 2012; 5-20
- SHERLOCK I. A. A importância dos flebotomíneos. In.: Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003; 15-21

- SHERLOCK I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996; 91(6): 671-683
- SHERLOCK IA, SHERLOCK VA. Criação e biologia, em laboratório do *Phlebotomus longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae). Rev Bras Biol, 1959; 19: 229-250.
- SILVA AL, WILLIAMS P, MELO MN, MAYRINK W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1990; 85: 453-458
- SILVA AR, TAUIL PL, CAVALCANTE MNS, MEDEIROS MN, PIRES BN, GONÇALVES EGR. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008; 41(4): 358-364
- SILVA CML, MORAES LS, BRITO GA, SANTOS CLC, REBÊLO JMM. Ecology of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in rural foci of leishmaniasis in tropical Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2012; 45(6): 696-700
- SILVA FS, CARVALHO LPC, CARDOZO FP, MORAES JLP, REBÊLO JMM. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Cerrado Area of the Maranhão State, Brazil. Neotropical Entomology, 2010; 39(6): 1032-1038
- SILVA LB, AQUINO DMC, LEONARDO FS, GUIMARÃES-E-SILVA AS, MELO MN, REBÊLO JMM, PINHEIRO VCS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos urbanos de leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. Revista de Patologia Tropical, 2015; 44(2): 181-193
- SILVA MH, NASCIMENTO MDSB, LEONARDO FS, REBÊLO JMM, PEREIRA SRF. Genetic differentiation in natural populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) with different phenotypic spot patterns on tergites in males. Neotropical Entomology, Londrina, 2011; 50: 501-506
- SINAN. Sistema de Informação Nacional. Investigação de Leishmaniose Visceral e Tegumentar dos Municípios do estado do Maranhão, 2017
- SOARES GHC, DA SILVA ABS, DE SOUSA FERREIRA LS, ITHAMAR JS, DE ALENCAR MEDEIROS G, PEREIRA SRF, LIMA MIS, C. AZEVEDO MPS. Case report: Coinfection by leishmania amazonensis and HIV in a Brazilian diffuse cutaneous leishmaniasis patient. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2020; 103: 1076–1080
- STIERHOF YD, BATES PA, JACOBSON RL, ROGERS ME, SCHLEIN Y, HANDMAN E, ILG T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. Eur J Cell Biol, 1999; 78: 675-689
- SVÁROVSKÁ A, ANT TH, SEBLOVÁ V, JECNÁ L, BEVERLEY SM, VOLF P. *Leishmania* (*L.*) *major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2010; 4(1): e580
- TAFURI WL, SANTOS RDL, ARANTES RME, GONÇALVES R, DE MELO MN, MICHALICK MSM, TAFURI WL. An alternative immunohistochemical method for detecting

- Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J. Immunol. Methods. 2004; 292: 17–23
- TANURE A, PEIXOTO JC, AFONSO MMS, DUARTE R, PINHEIRO AC, COELHO SVB, BARATA RA. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2015; 57(4): 321-324
- TEODORO U, KÜHL JB, RODRIGUES M, SANTOS ES, SANTOS DR, MARÓSTICA LMF. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1998; 31(6): 517-522
- TESH R, GUZMAN H. Sand flies and the agents they transmit. In BJ Beaty & WC Marquardt (eds), The Biology of Disease Vectors, University Press of Colorado, USA, 1996; p. 117-127
- TESH RB, CHANIOTIS BN, ARONSON MD, JOHNSON KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sand flies as determined by precipitin test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1971; 20: 150-156
- TESH RB. The genus Phlebotomus and its vectors. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 1988; 33: 169–181
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22: 4673–4680
- VALDERRAMA A, TAVARES MG, FILHO JDA. Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011; 106(8): 1049-1051
- VASSILIOS JK. Old World canine leishmaniasis. Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian, 1993; 15: 941-949
- VIANNA EM, MORAIS MHF, ALMEIDA AS, SABROZA PC, REIS IA, DIAS ES, CARNEIRO M. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016; 111(5): 302-310
- VIEIRA VR, AZEVEDO AC, ALVES JR, GUIMARÃES AE, AGUIAR M. Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. Journal of Medical Entomology, 2015; 52(5): 886-95
- VILELA ML, AZEVEDO CG, CARVALHO BM, RANGEL EF. Phlebotomine Fauna (Diptera: Psychodidae) and Putative Vectors of Leishmaniasis in Impacted Area by Hydroelectric Plant, State of Tocantins, Brazil. PLoS ONE, 2011; 6: 1-7.
- VOLF P, PECKOVA J. Sand flies and Leishmania: specific versus permissive vectors. Trends Parasitol. 23(3): 91–92. 2007

- VOLF P, VOLFOVA V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vect Ecol.* 2011; 36: S1-S9.
- WALTERS LL, MODI GB, CHAPLIN GL, TESH RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 41(3): 295-317
- WALTERS LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Eukaryot Microbiol*, 1993; 40: 196-206
- WARBURG A, FAIMAN R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J Vector Ecol.* 2011; 36 Suppl 1:S10-6
- WARD RD, RIBEIRO AL, READY PD, MURTAGH A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to Kala-zar distribution in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1983; 78: 269-280.
- WARD RD. Vector biology and control. In KP Chang & R Bray, *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York & Oxford; 1985; 199-212
- WILLIAMS P. Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1993; 88(2): 177-183
- YIN H, MUTEBI JP, MARRIOTT S, LANZARO GC. Metaphase karyotypes and G-banding in sandflies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med Vet Entomol*, 1999;13: 72-77
- YOSHIDA EL, MARQUES SDEA, STOLF HO, BARSOTTI LA, BUENO MM, SOGAYAR R. Natural infection of *Equus caballus* by *Leishmania* sp--Sao Paulo, Brazil. (Brief scientific communication). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1988; 30(2):79- 80
- YOUNG DG, DUCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida: Associated Publishers; 1994; 888p.
- YOUNG DG, PERKINS PV, ENDRIS RG. A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1981; 18: 446
- YOUNG DG, PERKINS PV. Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosq. News*, 1984; 44: 263-304
- ZIJLSTRA EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(11):e3258

ANEXOS

ANEXO A. Materiais suplementar dos artigos 1 e 2.

Anexo A1. Material suplementar do artigo 1: Maintenance and productivity of a *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) colony from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis, Northeastern Brazil

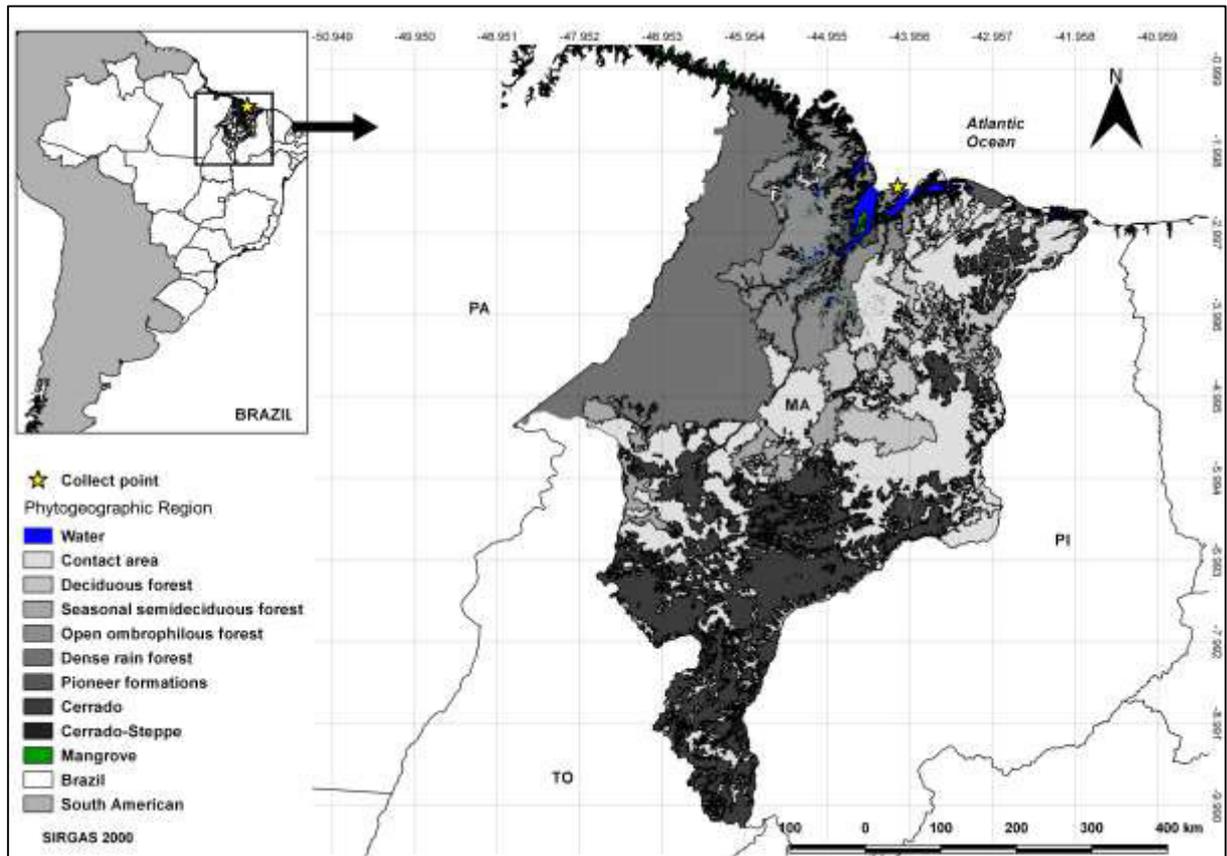


Figure 1S. Location of the collection point surveyed in the municipality of Raposa, São Luís, Maranhão, Brazil, from 2017 to 2019.

Anexo A2. Material suplementar do artigo 2: Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in mice

Supplementary Table 1. Number of female sandflies (*Lutzomyia longipalpis*) and mice used in the first and second blood meal, the rates of engorged and experimental infection rates in each experiment, and the outcomes of each mouse used in the second blood meal.

Groups	First blood meal (ExpA)						Second blood meal (ExpB)				Animal Outcomes	
	IM (N=8)	FE	EF	EFR (%)	IF	IR (%)	UNM (N=4)	FE	EF	IF		IR
	2						1					*Died
I		38	11	28.9	6	54.5		4	3	3	100.0	
II		41	9	21.9	7	77.8		3	1	0	0.0	
III		29	6	20.6	4	66.7		6	1	1	100.0	
Total		108	26	24.0	17	65.4		13	5	4	80.0	
	2						1					*Died
IV		37	11	29.7	11	100		6	0	-	-	
V		65	34	52.3	11	32.4		11	0	-	-	
VI		50	28	56.0	23	82.1		17	0	-	-	
VII		57	40	70.1	19	47.5		14	5	2	40.0	
Total		209	113	54.1	64	65.5		48	5	2	40.0	
	2						1					On the 96th day there were no lesions or <i>Leishmania</i> was detected
VIII		32	31	96.9	4	12.9		11	0	-	-	
IX		30	27	90.0	20	74.0		22	2	1	50.0	
X		27	19	70.4	10	52.6		0	0	-	-	
Total		89	77	86.5	34	46.5		33	2	1	50.0	
	2						1					On the 27th day there were lesions and <i>Leishmania</i> was detected
XI		51	48	94.1	20	42		36	3	2	66.7	
XII		28	27	96.4	18	52		16	2	1	50.0	
Total		79	75	94.9	38	47		52	5	3	60.0	
TOTAL		485	291	60	153	52.6		146	17	10	58.8	

IM means infected mice (107 promastigotes of *L. amazonensis* - IFLA/BR/1968/PH8); **FE** means Females exposed to feed on mice; **EF** means Engorged Females; **EFR** means Engorged Female Rate; **IF** means Infected Females; **IR** means Experimental Infection Rate; **UNM** means uninfected mice.

* Death of unknown cause within days after the mouse being a source of meal for the sandflies.

Supplementary Table 2. GenBank accession codes to the *ITS-1* DNA sequences obtained in this study.

Samples	Accession numbers
Isolate 04	MW282748
Isolate 05	MW282749
Isolate 06	MW282750
Isolate 07	MW282751
Isolate 10	MW282752
Isolate 12	MW282753

Supplementary Table 3. DNA sequences of selected *Leishmania* species from the GenBank repository, NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sequences without references were submitted directly and were not linked to a publication until the completion of this work.

Species	References	Access Codes
<i>Leishmania aethiopica</i>	Van Der Auwera et al. (2014) [1]	HG512923
<i>Le. amazonensis</i>	Coser et al. (2020) [2]	MT523027.1
<i>Le. amazonensis</i>	nd	MT606271.1
<i>Le. braziliensis</i>	nd	FN398337
<i>Le. braziliensis</i>	Zauli et al. (2012) [3]	JQ061322
<i>Le. donovani</i>	Kuhls et al. (2005) [4]	AJ634378
<i>Le. donovani</i>	Alam et al. (2009) [5]	AM901453
<i>Le. guyanensis</i>	nd	FN398331
<i>Le. infantum</i>	De Almeida et al. (2011) [6]	GU045591
<i>Le. infantum</i>	Paniz Mondolfi et al. (2011) [7]	FR675940
<i>Le. major</i>	Van Der Auwera et al. (2014) [1]	HG512962
<i>Le. major</i>	Van Der Auwera et al. (2014) [1]	HG512963
<i>Le. mexicana</i>	Muñoz-García et al. (2019) [8]	MH885526.1
<i>Le. peruviana</i>	nd	FN398340
<i>Le. turanica</i>	nd	AJ000309
<i>Le. turanica</i>	nd	AJ272379
<i>Le. panamensis</i>	Van Der Auwera et al. (2014) [1]	HG512959
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Santos et al. (2002) [9]	AF362831

ANEXO B. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Experimentação Animal: Estudo da capacidade e competência de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) como vetor de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA CIAEP: 01.0341.2014	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da capacidade e competência vetorial de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) para <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> em condições experimentais." registrada com o nº 23115.006003/2017-11, sob a responsabilidade de José Manuel Macário Rebêlo, que envolve a produção, manutenção 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 considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.</p>		
FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO	
Vigência da autorização	05/06/2018 à 05/02/2021	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/BALB/c <i>Mus musculus</i>	
Nº de animais	56	
Peso/Idade	25 -30g/2 meses	
Sexo	Machos	
Origem	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)	
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA		

ANEXO C. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Experimentação Animal: manutenção de *Leishmania* spp. em hamster (*Mesocricetus auratus*)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA CIAEP: 01.0341.2014	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "MANUTENÇÃO DE Leishmania spp EM HAMSTER (<i>Mesocricetus auratus</i>)", Processo 23115.038067/2018-62, sob a responsabilidade de SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA, que envolve a produção, manutenção 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 considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.</p>		
FINALIDADE	<input type="checkbox"/> ENSINO <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISA <input type="checkbox"/> EXTENSAO	
Vigência da autorização	14/01/2019 à 01/12/2023	
Espécie/linhagem/raça	Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	
Nº de animais	08	
Peso/Idade	20-25g/60 dias	
Sexo	Machos	
Origem	Terra Zoo - CNPJ: 06.256.879/0007-09	
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA		

ANEXO D. Carta de responsabilidade enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, informando que o insetário do Laboratório de Insetos Vetores –UFMA tem plenas condições de manutenção de insetos vetores e proteção dos ambientes adjacentes, para realização de experimentos que envolvam competência vetorial, sem risco humano.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 Fundação instituída nos termos da lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

São Luís, 29 de maio de 2018

Ilmo. Sr.
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Senhor Presidente,

Estamos nos dirigindo a vossa senhoria para esclarecer alguns pontos referentes ao processo nº 23115.006003/2017-11 — Projeto de pesquisa *Estudo da capacidade e competência vetorial de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) para Leishmania brasiliensis e Leishmania amazonensis em condições experimentais.*

Primeiro, constatamos que não existe nenhuma regulamentação oficial que trata do estabelecimento e manutenção de colônias de insetos vetores em laboratório de pesquisa. Nesse caso, e pela urgência que o referido projeto requer, a coordenação do Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV) assume a responsabilidade pela implantação e desenvolvimento da colônia de flebotomíneos para fins de pesquisa.

Segundo, o professor titular, doutor JOSÉ MANUEL MACÁRIO REBÊLO, coordenador do Laboratório de Entomologia e Vetores passa a ser responsável pela adequação da infraestrutura do laboratório para a correta manipulação e manutenção da referida colônia.

Terceiro, a colônia de flebotomíneos é fundamental para o desenvolvimento do projeto de pesquisa da doutoranda Rosa Cristina Ribeiro da Silva. Considerando que esta pesquisadora é mantenedora da colônia, automaticamente passa também a responder pela correta manipulação da colônia em todas as suas fases.

Por fim, ressaltamos que os insetos estão mantidos em local adequado e protegido contra a fuga, que é o insetário (sala de criação de insetos) localizado no LEV. O insetário é dividido em duas salas: i) sala do criatório, onde a colônia é mantida no interior de duas estufas verticais tipo B.O.D. Para a biossegurança esta sala é mantida fechada e isolada com permissão de entrada apenas para os pesquisadores responsáveis. As três janelas desta sala estão devidamente teladas, com tela ultrafina que impede a passagem de insetos das dimensões dos flebotomíneos (3 mm); a única porta é emborrachada para prevenir fuga dos insetos ii) sala de manipulação, ante-sala necessária para triagem dos insetos, preparação de material da colônia, contendo as mesmas adaptações do criatório. Diante do exposto, nos colocamos à sua disposição para quaisquer outros esclarecimentos.

Atenciosamente,

Rosa Cristina Ribeiro da Silva
 Rosa Cristina Ribeiro da Silva
 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
 Mat. 2016107950

José Manuel Macário Rebêlo
 Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo
 Coordenador do Laboratório de Entomologia e Vetores
 Mat. 76635
 Coordenador do Projeto

ANEXO E. Autoria em artigo publicado: Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban Leishmaniasis Transmission Foci in North-Eastern Brazil

Journal of Medical Entomology, 56(1), 2019, 247–253

doi: 10.1093/jme/tjy182

Advance Access Publication Date: 30 October 2018

Research Article

Vector-Borne Diseases, Surveillance, Prevention



Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban Leishmaniasis Transmission Foci in North-Eastern Brazil

Rosa Cristina Ribeiro da Silva,^{1,2,3,✉} Antonia Suely Guimarães e Silva,^{1,2} Sêmilly Suélen da Silva Sousa,^{1,2} Juliana Maria Trindade Bezerra,^{4,✉} José Manuel Macário Rebêlo,³ and Valéria Cristina Soares Pinheiro^{1,2,5}

¹Laboratório de Entomologia Médica da Universidade Estadual do Maranhão (LABEM-UEMA), Centro de Estudos Superiores de Caxias, Morro do Alecrim, s/n, Caxias, Maranhão, 65.604-380, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Morro do Alecrim, s/n, Caxias, Maranhão, 65.604-380, Brazil, ³Laboratório de Entomologia e Vetores da Universidade Federal do Maranhão (LEV-UFMA), Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, 65080-805, Brazil, ⁴Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6.627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil, and ⁵Corresponding author, e-mail: vc_pinheiro@hotmail.com

Subject Editor: Lane Foil

Received 6 April 2018; Editorial decision 18 August 2018

Abstract

In this study, we analyzed species composition, richness, and monthly and seasonal abundance of sand flies in an urban area, municipality Caxias, state Maranhão, endemic for American visceral and tegumentary leishmaniasis. Sand flies were caught using Center for Disease Control (CDC) light traps in peridomicile (animal shelter) and extradomicile (forest) environments twice a month for 1 yr. A total of 16,332 specimens belonging to 20 species were captured. The predominant species identified in this study were *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) (Lutz and Neiva 1912) (43.08%) and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) (Antunes and Coutinho 1939) (43.02%), which occurred throughout the year (every month). The highest abundance of phlebotomine was recorded during the dry season (53.75%) and in the urban peridomicile environment (59.1%), wherein 17 species were found. In the study area, *L. longipalpis* and *L. whitmani* are reported to be effective visceral or tegumentary leishmaniasis vectors, respectively, due to their abundance throughout the year.

Key words: biological vector, American visceral leishmaniasis, American tegumentary leishmaniasis, urbanization

ANEXO F. Co-autoria em artigo publicado: *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis



RESEARCH ARTICLE

Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis

Antônia Suely Guimarães-e-Silva¹, Sorala de Oliveira Silva², Rosa Cristina Ribeiro da Silva¹, Valéria Cristina Soares Pinheiro¹, José Manuel Macário Rebêlo³, Maria Norma Melo^{2*}

1 Centro de Estudos Superiores de Caxias, Laboratório de Entomologia Médica (LABEM), Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, Maranhão, Brazil, **2** Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia de *Leishmania*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Biologia, Laboratório de Entomologia e Vetores, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

* melo@icb.ufmg.br, normamelo@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Guimarães-e-Silva AS, Silva SdO, Ribeiro da Silva RC, Pinheiro VCS, Rebêlo JMM, Melo MN (2017) *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. PLoS ONE 12(8): e0179052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179052>

Editor: Bhisak Saha, National Centre For Cell Science, INDIA

Received: January 3, 2017

Accepted: May 23, 2017

Published: August 24, 2017

Copyright: © 2017 Guimarães-e-Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data underlying the findings described in our paper are fully available without restriction. We also specify that the data underlying the results described in the paper can be found freely available to other researchers in the Supporting Information.

Funding: This work is supported by Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, MNM; Fundação de Amparo à Pesquisa e ao

Abstract

The aims of the study were to determine the blood feeding preferences of sandflies and to identify species of *Leishmania* that infected phlebotomines in Caxias, Maranhão, Brazil, an area that is highly endemic for leishmaniasis. Sandflies were captured in light traps located in the peridomestic environments of randomly selected houses in urban and rural settings between 1800 and 0600 hours on new moon days between March 2013 and February 2015. DNA extracts from 982 engorged female sandflies were submitted to fragment length polymorphism analysis to identify infecting species of *Leishmania*, and blood sources were identified for 778 of these specimens. Infection by *Leishmania infantum* was detected in *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. whitmani* and *Lu. termitophila*; *L. infantum*/*L. braziliensis* in *Lu. longipalpis*, *Lu. whitmani* and *Lu. trinidadensis*; *L. shawi* in *Lu. longipalpis*; *L. mexicana* in *Lu. longipalpis*; *L. braziliensis* in *Lu. longipalpis* and *Lu. whitmani*; *L. guyanensis* in *Lu. longipalpis* and *Lu. termitophila*; *L. amazonensis* in *Lu. longipalpis* and *L. lainsoni* or *L. naiffi* in *Lu. longipalpis*, while *Lu. longipalpis* and *Lu. trinidadensis* were infected with unidentified *Leishmania* sp. Blood sources were identified in 573 individual phlebotomines and the preferred hosts were, in decreasing order, chicken, dog, rodent and human with lower preferences for pig, horse, opossum and cattle. *Lu. longipalpis* and *Lu. whitmani* performed mixed feeding on man, dog and rodent, while *Lu. longipalpis* was the most opportunistic species, feeding on the blood of all hosts surveyed, but preferably on dog/chicken, dog/rodent and rodent/chicken. Our findings reveal the concomitant circulation of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis and tegumentary leishmaniasis in the study area, and explain the occurrence of autochthonous human cases of both clinical forms of leishmaniasis in Caxias, Maranhão. The results support our hypothesis that, in the municipality of Caxias, transmission of *Leishmania* occurs in close proximity to humans.