

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei*
(Diptera:Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum*

RECIFE

2016

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Co-orientador: Dr. Petr Volf

Recife

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

G963a Guimaráes, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso.
Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum* / Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães. - Recife: [s.n.], 2016.
84 p. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho, co-orientador: Petr Volf.

1. Psychodidae 2. *Leishmania infantum* - parasitologia. 3. *Leishmania infantum* - crescimento & desenvolvimento. 4. Insetos vetores. 1. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Volf, Petr. III. Título.

CDU 616.993.161

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 27/04/16

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sival Pinto Brandão Filho

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dr. Luiz Carlos Alves

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Jeffrey Jon Shaw

Universidade de São Paulo (USP)

*À minha mãe Auxiliadora, exemplo de vida;
Ao meu esposo Washington e ao meu filho Caio,
que são a minha força;*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas e pelo aprendizado adquirido em cada dificuldade.

Ao alicerce da minha vida, minha família, que me proporcionou o amor, o apoio e o encorajamento necessários para que eu pudesse realizar mais uma conquista.

Ao Dr. Sinval Brandão Filho pela amizade, incentivo e aprendizado construídos ao longo desses 10 anos de convivência. Agradeço pela valiosa oportunidade profissional e pela confiança depositada em conduzir um trabalho desta magnitude.

Ao Prof. Petr Volf pela receptividade, paciência e valiosos ensinamentos que foram fundamentais para o meu amadurecimento profissional e pessoal durante o período que estive em Praga. Agradeço a toda a sua equipe em especial a Jovana Sádlová, Katerina Pruzinova e Vera Volfova por todo o aprendizado.

À Dra. Milena de Paiva Cavalcanti, pelas sugestões e incentivo.

A Pietra Costa, Débora Miranda e Fernando Silva por todas as contribuições durante o trabalho de campo.

A Kyldman Silva pela amizade e pelas contribuições na colônia dos flebotomíneos.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoparasitologia que torceram pela realização deste trabalho.

Aos colegas de turma do Doutorado (2012-2016), pela amizade e convívio durante o curso.

Aos moradores de Baturité-CE, pela receptividade durante o trabalho de campo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Ciência sem Fronteiras pelo suporte financeiro.

“A pouca ciência afasta de Deus; a muita ciência leva a Deus”.

Louis Pasteur

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso. Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Leishmania (Leishmania) infantum é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) mais disseminado no mundo, com taxas de mortalidade significativas em casos humanos. Na América Latina, este parasito é transmitido principalmente por *Lutzomyia longipalpis*, entretanto, o papel de *Lutzomyia migonei* como um potencial vetor deste protozoário tem sido discutido. Investigações laboratoriais e de campo têm contribuído para esta hipótese, no entanto, a prova da competência vetorial de *L. migonei* ainda não foi fornecida. Neste estudo, foi avaliada pela primeira vez a susceptibilidade de *L. migonei* para duas cepas de *L. (L.) infantum* e realizada a comparação com o desenvolvimento em *L. longipalpis*. A colônia de *L. migonei* foi estabelecida na Faculdade de Ciências da Charles University em Praga, República Tcheca de espécimes capturados no município de Baturité, estado do Ceará. As fêmeas foram alimentadas através de uma membrana de pele de pinto com sangue de coelho contendo promastigotas de *L. (L.) infantum*, dissecadas no 1º, 5º e 8º dias pós-infecção (PI) e verificadas microscopicamente quanto a presença, intensidade e localização de infecções por *Leishmania*. Adicionalmente, a análise morfométrica de *L. (L.) infantum* foi realizada. Altas taxas de infecção de ambas as cepas avaliadas foram observadas em *L. migonei*, com a colonização da válvula do estomodeu já no dia 5º PI. Na infecção em estágio final (8º dia PI), a maioria das fêmeas de *L. migonei* tiveram a região da cárdia e a válvula do estomodeu colonizadas por um elevado número de parasitos, e não foram observadas diferenças significativas em relação ao desenvolvimento de *L. longipalpis*. Formas metacíclicas foram encontradas em todas as combinações vetor-parasito desde o 5º dia PI. Os dados demonstram que *L. migonei* é altamente susceptível ao desenvolvimento de *L. (L.) infantum*. Estes resultados juntamente com a antropofilia da espécie, abundância em focos da (LV) e a infecção natural por *L. (L.) infantum*, constitui uma prova importante que *L. migonei* é outro vetor do parasito na América Latina.

Palavras-chave: *Lutzomyia migonei*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, competência vetorial.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso. Evaluation of the susceptibility of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) to *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2016. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Leishmania (Leishmania) infantum is the most widespread etiological agent of visceral leishmaniases (VL) in the world, with significant mortality rates in human cases. In Latin America, this parasite is primarily transmitted by *Lutzomyia longipalpis*, but the role of *Lutzomyia migonei* as a potential vector for this protozoan has been discussed. Laboratory and field investigations have contributed to this hypothesis. However, proof of the vector competence of *L. migonei* has not yet been provided. In this study, we evaluate for the first time the susceptibility of *L. migonei* to two *L. (L.) infantum* strains and compared with development of *L. longipalpis*. Colony of *L. migonei* was established at Faculty of Science, Charles University in Prague from specimens captured in Baturité municipality, Ceará state. Females were fed through a chick-skin membrane on rabbit blood containing *L. (L.) infantum* promastigotes, dissected at 1, 5 and 8 days post-infection (PI) and checked microscopically for the presence, intensity and localization of *Leishmania* infections. In addition, morphometric analysis of *L. (L.) infantum* promastigotes was performed. High infection rates of both *L. (L.) infantum* strains tested were observed in *L. migonei*, with colonization of the stomodeal valve already on day 5 PI. At the late-stage infection, most *L. migonei* females had their cardia and stomodeal valve colonized by high numbers of parasites, and no significant differences were found compared to the development in *L. longipalpis*. Metacyclic forms were found in all parasite-vector combinations since day 5 PI. We propose that *L. migonei* belongs to sand fly species permissive to various *Leishmania*. Here we demonstrate that *L. migonei* is highly susceptible to the development of *L. (L.) infantum*. This, together with its known anthropophily, abundance in VL foci and natural infection by *L. (L.) infantum*, constitute important evidence that *L. migonei* is another vector of this parasite in Latin America.

Keywords: *Lutzomyia migonei*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, vector competence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral no mundo, 2013.	18
Gráfico 1 -	Casos notificados de leishmaniose visceral no Brasil, por região, durante o período de 2000 a 2014.	19
Figura 2 -	Ciclo evolutivo dos flebotomíneos.	23
Figura 3 -	Diferentes formas de desenvolvimento de <i>Leishmania</i> nos flebotomíneos.	26
Figura 4 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp no vetor.	27
Figura 5 -	Estutura bioquímica do lipofosfoglicano (LPG) de <i>Leishmania</i> .	34
Figura 6 -	Alterações na alimentação dos flebotomíneos devido ao plug de (PSG).	39
Figura 7 -	Vista panorômica do município de Baturité, Ceará.	43
Figura 8 -	Locais de captura de <i>Lutzomyia migonei</i> no município de Baturité, Ceará.	43
Figura 9 -	Materiais utilizados para o acondicionamento dos flebotomíneos.	44
Figura 10 -	Animais e equipamentos utilizados para o estabelecimento e manutenção da colônia de <i>Lutzomyia migonei</i> .	45
Figura 11 -	Método de alimentação artificial dos flebotomíneos.	48
Gráfico 2 -	Percentual de fêmeas de <i>Lutzomyia migonei</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas por <i>L. (L.) infantum</i> e densidade de parasitos no intestino.	52

- Gráfico 3** - Localização da infecção de *L. (L.) infantum* de acordo com os dias pós-infecção em diferentes regiões do intestino de fêmeas de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis*. 53
- Figura 12** - Intestino médio torácico com a região da cárdia e a válvula do estomodeu de *Lutzomyia migonei*. 54
- Figura 13** - Formas morfológicas de *L. (L.) infantum* encontradas no intestino de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* no 8º dia PI. 55
- Gráfico 4** - Formas morfológicas de *L. (L.) infantum* durante o desenvolvimento em *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis*. 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Duração do ciclo de vida de *Lutzomyia migonei* em condições laboratoriais. 51
- Tabela 2-** Dimensões das formas morfológicas de *L. infantum* descritos no gráfico 4 durante o desenvolvimento em *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* no 5° e 8° dias PI. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	Center for Disease Control (Armadilha Luminosa)
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
DPM	Desvio Padrão da Média
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fPPG	Filamentos de proteofosfoglicanos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HIV	Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Intestino Médio Abdominal
IMT	Intestino Médio Torácico
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MP	Matriz peritrófica
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PG	Fosfoglicano
PL	Promastigota Leptomona
PM	Promastigota Metacíclica
PN	Promastigota Nectomona
PSG	Promastigote Secretory Gel (Gel Secretado por Promastigotas)
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	17
2.1	Leishmanioses como problema de saúde pública	17
2.2	Leishmaniose visceral: etiologia e hospedeiros reservatórios	20
2.3	Flebotomíneos: taxonomia, distribuição e biologia	21
2.4	Flebotomíneos como vetores de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	24
2.5	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	26
2.6	Barreiras naturais ao desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no vetor	29
2.6.1	<i>Enzimas digestivas</i>	30
2.6.2	<i>Matriz peritrófica (MP)</i>	32
2.6.3	<i>Fixação dos parasitos ao epitélio intestinal</i>	34
2.6.4	<i>Sistema imune</i>	36
2.6.5	<i>Migração dos parasitos para região anterior e sua regurgitação durante repasto sanguíneo</i>	37
3	JUSTIFICATIVA	40
4	PERGUNTA CONDUTORA	41
5	OBJETIVOS	42
5.1	Objetivo geral	42
5.2	Objetivos específicos	42
6	MATERIAL E MÉTODOS	43
6.1	Captura dos flebotomíneos	43
6.2	Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>L. migonei</i>	44
6.3	Manutenção da colônia de <i>L. longipalpis</i>	46
6.4	Cultivo de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> e contagem dos parasitos	46
6.5	Infecção experimental de flebotomíneos	47
6.6	Desenvolvimento e localização de <i>Leishmania (Leishmania) infantum in situ</i>	48
6.7	Morfometria dos parasitos	49
6.8	Análise estatística	49
7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
8	RESULTADOS	51
8.1	Ciclo evolutivo de <i>L. migonei</i> em condições laboratoriais	51

8.2	Desenvolvimento de <i>L. (L.) infantum</i> em <i>L. migonei</i> e <i>L. longipalpis</i>	52
8.3	Análise morfométrica de promastigotas de <i>L. infantum</i> em <i>L. migonei</i> e <i>L. longipalpis</i>	54
9	DISCUSSÃO	58
10	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A – Artigo Publicado	79

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do gênero *Leishmania*, transmitidos para os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) (MAROLI et al., 2013; READY, 2013). Atualmente, afetam 12 milhões de pessoas em 98 países, com cerca de 1,3 milhões de novos casos e 20 a 40 mil mortes por ano (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

Apesar da existência de mais de 988 espécies de flebotomíneos em diversas regiões do mundo (BATES et al., 2015; GALATI, 2014), a transmissão de *Leishmania* para os seres humanos inclui espécies apenas pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (KILLICK-KENDRICK, 1990; YOUNG; DUNCAN, 1994; READY, 2013). Destas, aproximadamente, 500 foram descritas nas Américas (GALATI, 2014) e 56 estão envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*, incriminadas como vetoras baseando-se nas características antropofílicas, na identificação da infecção natural e na distribuição geográfica do vetor em associação com o registro de casos humanos da doença (KILLICK-KENDRICK, 1990, 1999; MAROLI, 2013).

De fato, a incriminação de uma espécie de flebotomíneo como um vetor é baseada em uma série de critérios que incluem, além das condições anteriormente citadas, a capacidade do parasito em superar as barreiras existentes do intestino médio do vetor e completar o seu desenvolvimento após a digestão do repasto sanguíneo. Além disso, o inseto deve ser capaz de transmitir o parasito a um hospedeiro susceptível, caracterizando a sua competência vetorial (BATES et al., 2015; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KILLICK-KENDRICK, 1990; SACKS; KAMHAWI, 2001).

No entanto, há restritas informações sobre vários destes aspectos, particularmente no Novo Mundo, de modo que algumas espécies de flebotomíneos têm sido consideradas como possíveis vetores da leishmaniose visceral (LV), causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (sinônimo de *Leishmania chagasi*) sem a avaliação da susceptibilidade ao parasito (CARVALHO et al., 2008, 2010; MONTOYA-LERMA et al., 2003; MOYA et al., 2015; PITA-PEREIRA et al., 2008; SALOMÓN et al., 2010; SANTOS et al., 1998; SAVANI et al., 2009).

No Brasil, a principal espécie associada à transmissão da LV é *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005; ROMERO; BAELAERT, 2010). Contudo, o papel vetorial de *Lutzomyia migonei* também tem sido discutido em áreas com registro de casos humanos e

caninos da doença onde o vetor comprovado não está presente (CARVALHO et al., 2007, 2010; SOUZA et al., 2003).

L. migonei é uma espécie amplamente distribuída na América Latina, inclusive no Brasil, onde pode ser encontrada nos domicílios e abrigos de animais, com capacidade de adaptação a ambientes modificados (AZEVEDO; RANGEL, 1991; FORATTINI et al., 1973; GUIMARÃES et al., 2012; RANGEL; LAINSON, 2009). Além disso, a espécie é antropofílica e alimenta-se em cães, galinhas e equinos, bem como de animais silvestres (AGUIAR et al., 1987; FORATTINI et al., 1973). Ademais, *L. migonei* é vetor comprovado de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (NIEVES; PIMENTA, 2000).

No estado de Pernambuco, *L. migonei* é relatada principalmente em áreas rurais, inclusive no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte, onde a espécie predomina com 72% da fauna local (GUIMARÃES et al., 2012) e onde há registro da taxa de infecção natural de 4% por *L. (L.) infantum* (CARVALHO et al., 2010). No estado do Rio de Janeiro, a participação de *L. migonei* como vetor de *L. (L.) infantum* foi sugerida em seis áreas de ocorrência de casos autóctones de LV sem o registro de *L. longipalpis* (SOUZA et al., 2003).

Aspectos epidemiológicos de *L. migonei* também foram estudados na cidade de La Banda, na Argentina, em área de transmissão da LV, na qual foi relatada a elevada densidade da espécie (93% da fauna) associada a casos humanos e caninos no ambiente peridomiciliar (SALOMÓN et al., 2010). Posteriormente, o relato de infecção natural de *L. migonei* por *L. (L.) infantum* reforçou a hipótese de participação no ciclo de transmissão do parasito (MOYA et al., 2015).

Apesar das características epidemiológicas e comportamentais que indicam a participação de *L. migonei* no ciclo de transmissão do parasito, não existem estudos que demonstrem o desenvolvimento de *L. (L.) infantum* nesta espécie. Estudos sobre a interação *Leishmania*-vetor nas populações de flebotomíneos são importantes e podem contribuir para uma melhor compreensão do potencial de transmissão e sobre os fatores que influenciam a epidemiologia da doença em uma determinada área. Neste sentido, o presente estudo visou avaliar a susceptibilidade de espécimes colonizados de *L. migonei* ao desenvolvimento de *L. (L.) infantum*.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Leishmanioses como problema de saúde pública

Protozoários do gênero *Leishmania*, são parasitos digenéticos que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São os agentes causadores de um amplo conjunto de doenças conhecidas como leishmanioses, as quais variam em suas manifestações clínicas e sintomas, nas formas visceral e tegumentar dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão e da resposta imunológica do hospedeiro (READY, 2010).

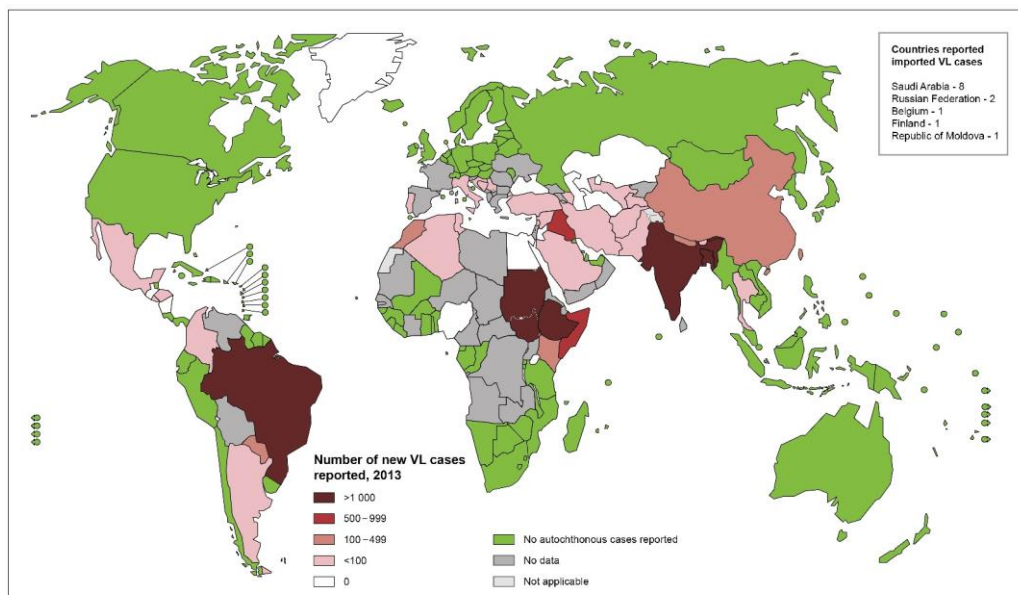
São doenças de evolução crônica, particularmente a forma tegumentar, manifesta-se por lesões cutâneas que podem ser única ou múltiplas, bem como lesões mucosas, que ocorrem no local da picada do inseto vetor e podem resultar em deformidades severas (REITHINGER et al., 2007; RUAS et al., 2014). A forma visceral é a mais grave, caracterizada por hepatoesplenomegalia e linfadenopatia e exibe taxas de letalidade que variam de 10 a 20%, constituindo-se em um importante problema de saúde pública (ALVAR et al., 2012; ARAÚJO et al., 2012).

As leishmanioses constituíram por vários anos endemias predominantemente silvestres e rurais (DEANE; DEANE, 1955; LAINSON, 1988; SHAW, 2007). As mudanças ambientais, o acelerado processo de urbanização e a migração para áreas endêmicas, modificaram o padrão epidemiológico tradicional (DESJEUX, 2004; PAVLI; MALTEZOU, 2010). Estes aspectos, associados à persistência de condições inadequadas de vida, têm aumentado a frequência de casos em áreas urbanas (ARAÚJO et al., 2013; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a), sendo evidente a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; CLEM, 2010; DESJEUX, 2004).

Atualmente, as leishmanioses ocorre em 98 países nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo países das Américas, África, Ásia, Oriente Médio e Europa (CHAPPUIS et al., 2007; MAROLI et al., 2013), sendo considerada como principais doenças tropicais negligenciadas (ALVAR et al., 2012). Estima-se que a prevalência seja de cerca de 12 milhões de pessoas e que, a cada ano, 400 mil desenvolvem a forma visceral e 1,2 milhões a forma tegumentar da doença. Entretanto, um número significativo de casos não são registrados devido à notificação ser obrigatória em apenas 32 países (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

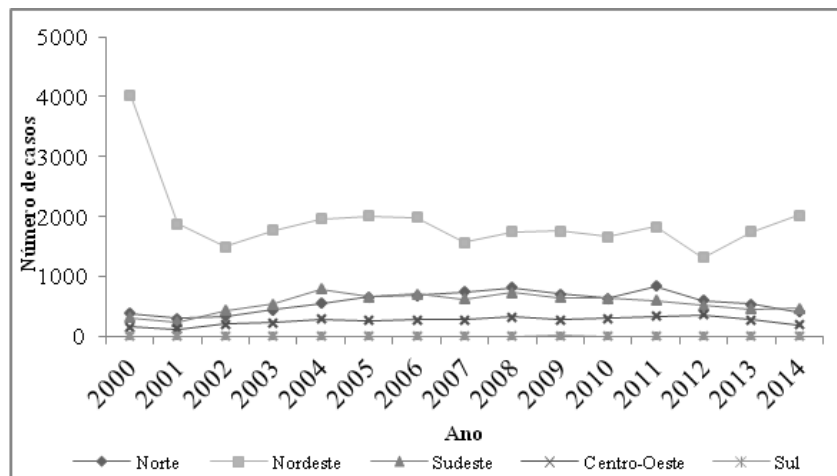
A situação da LV é uma das mais preocupantes no cenário da saúde pública mundial, onde 90% dos casos ocorrem em apenas seis países: Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia (ALVAR et al., 2012) (Figura 1). O aumento na distribuição da doença é devido, em parte, a co-infecções com HIV/AIDS, desnutrição e fatores genéticos (ALVAR et al., 2008, 2012; DANTAS-TORRES, BRANDÃO-FILHO 2006b; READY, 2014),

Figura 1 – Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral no mundo, 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2015).

No Brasil, a LV apresenta-se em expansão geográfica nos últimos anos. Em 2009, foram registrados 3.693 casos autóctonos em 21 unidades federadas de todas as regiões, sendo confirmados os primeiros casos na região Sul. Apesar de o maior número se concentrar na região Nordeste, a análise da série histórica indica uma redução nesta região que passou de 83% (4.029/4.858) do total de confirmados em 2000, para 58,5% (2.022/3.453) em 2014. A doença tem se expandido, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 30,4% (1.052/3.453) em 2014 (Gráfico 1) (SISTEMA DE INFORMAÇÃO NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2016).

Gráfico 1- Casos notificados de leishmaniose visceral no Brasil, por região, durante o período de 2000 a 2014.

Fonte: Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (2016).

A LV tem sido observada no Nordeste do Brasil desde a década de 1930 (ARRUDA, 1949; DEANE; DEANE, 1962), sendo o primeiro relato no estado de Pernambuco em 1934 com casos humanos esporádicos (PENNA, 1934). No período entre 1990 e 2001, o número de municípios que haviam notificado um ou mais casos da doença praticamente aumentou cinco vezes, elevando-se de 28 para 144 municípios pernambucanos, de forma que, atualmente a LV apresenta incidência em praticamente todo estado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a; GUIMARÃES et al., 2014).

Os casos de LV em Pernambuco concentram-se nos municípios do Sertão, merecendo destaque Petrolina, Salgueiro, Dormentes, Ouricuri e Santa Maria da Boa Vista (LEISHMANIOSE, 2009). Não menos importantes, Caruaru, Altinho, Surubim, São Caitano e Riacho das Almas, localizados no Agreste do estado, apresentam número significativos de casos, assim como Itamaracá na Região Metropolitana do Recife e Goiana, na Zona da Mata (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a).

O padrão epidemiológico da LV em Pernambuco possui semelhança com o de outros estados do país, nos quais o aumento da incidência em áreas urbanas está relacionado à pressão antrópica sobre o meio ambiente (AGUIAR et al., 2003; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005). Apresenta incidência em todas as faixas etárias, acometendo em sua maioria crianças menores de 10 anos e adultos jovens do sexo masculino (ARAÚJO et al., 2012).

No estado do Ceará, a LV é endêmica em todas as sete mesorregiões, 33 microrregiões e em 162 dos 184 municípios. No período de 2007 a 2011, foi observada uma média anual de

596,8 ± 29,65 casos, o que corresponde a aproximadamente 15% dos casos do país, com uma incidência de 6,1 casos/100 mil habitantes e prevalência de 7,1 casos/100 mil habitantes. Dos 184 municípios cearenses, 16 municípios apresentam transmissão intensa da doença, 23 municípios apresentam transmissão moderada e 123 apresentam transmissão esporádica. A capital Fortaleza é o município com a maior quantidade de casos no país, com aproximadamente 5,6% dos casos nacionais (CAVALCANTE; VALE, 2014).

O aumento da densidade populacional humana, a diversidade de vetores, espécies de *Leishmania*, reservatórios, condições ecológicas, epidemiológicas e culturais contribuem para aumentar a disseminação das leishmanioses. Da mesma forma, a subnotificação dos casos, a ausência de uma vacina capaz de imunizar a população humana, o surgimento de resistência parasitária às drogas administradas, a ausência de novas drogas para o tratamento e a substituição de programas de controle por ações esporádicas dificultam o estabelecimento de políticas públicas melhor direcionadas e eficazes.

2.2 Leishmaniose visceral: etiologia e hospedeiros reservatórios

A LV é causada por protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear, pertencente ao complexo *Leishmania donovani*. Na América Latina, região Mediterrânea e Europa a doença é causada por *L. (L.) infantum*, enquanto que na África e Índia o agente etiológico é *L. (L.) donovani* (READY, 2014).

Desde a primeira descrição de *L. (L.) chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937) como espécie responsável pela doença nas Américas, a nomenclatura e, particularmente, a origem do agente etiológico da LV tem causado opiniões divergentes entre os pesquisadores. A doença tem sido atribuída por muitos autores a *L. (L.) chagasi*, para o agente etiológico nas Américas, diferenciando-o da *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908), própria da região Mediterrânea (DESJEUX, 1992). Alguns afirmam que as espécies são idênticas e que foram importadas para o continente durante as invasões portuguesas e espanholas (KILLICK-KENDRICK, 1985, RIOUX et al., 1990). Outros autores acreditam que *L. (L.) chagasi* já estava presente no Continente Americano antes da colonização Européia e as classificam como subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). Baseados em estudos bioquímicos e moleculares, Maurício, Stothard e Miles (2000), afirmam que *L. (L.) infantum*, e *L. (L.) chagasi*, são a mesma espécie e, portanto, devem ser consideradas como sinônimos, tendo prioridade a nomenclatura mais antiga.

Existem dois tipos de LV as quais diferem em suas características de transmissão: a zoonótica, transmitida do animal para o vetor e para o humano, encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) infantum*, e antroponótica, transmitida de humano a humano pelo vetor, encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) donovani* (MAROLI et al., 2013; READY, 2004).

Dentre as diversas espécies de mamíferos no Novo Mundo que podem atuar como reservatório de *L. (L.) infantum*, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é o único reservatório primário confirmado do parasito (COURTENAY et al., 2014; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014). No entanto, a infecção natural no gato doméstico (*Felis silvestres catus*) também tem sido descrita (COELHO et al., 2010; SAVANI et al., 2004), demonstrando a necessidade de estudos que esclareçam o real papel destes animais como reservatórios. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (ALENCAR, 1961; COURTENAY et al., 2002; DEANE; DEANE, 1955, ROQUE; JANSEN, 2014). Marsupiais didelfídeos (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (HUMBERG et al., 2012; QUINNELL; COURTENEY, 2009; SHERLOCK, 1996) e roedores (*Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Holochilus sciurus*) foram encontrados naturalmente infectados no Brasil, na Colômbia e na Venezuela (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; LIMA et al., 2013; TRAVI et al., 1998; ZULUETA et al., 1999), e podem estar envolvidos na manutenção do parasito em áreas endêmicas.

2.3 Flebotomíneos: taxonomia, distribuição e biologia

Os flebotomíneos são dípteros que pertencem a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, agrupados nos gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994). Estão presentes principalmente nas zonas quentes da Ásia, África, Austrália, Sul da Europa e das Américas. Na subfamília Phlebotominae, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os que apresentam importância médica, pela ampla distribuição geográfica e pela capacidade de transmitir *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1999; READY, 2013).

São conhecidas cerca de 988 espécies destes insetos no mundo, 269 delas são registradas no Brasil (GALATI, 2014), representando uma das faunas mais bem estudadas. Estima-se que 98 espécies, sendo 42 do gênero *Phlebotomus* e 56 do gênero *Lutzomyia*, são capazes de transmitir o parasito no mundo (MAROLI et al., 2013). A primeira evidência

experimental de transmissão de *Leishmania* pela picada de flebotomíneos foi descrita por Shortt et al. (1931), que demonstrou a transmissão de *L. (L.) donovani* para hamsters (*Mesocricetus auratus*) por espécimes de *P. argentipes*.

Algumas espécies de flebotomíneos além de transmitir *Leishmania*, estão envolvidas na transmissão de bactérias como *Bartonella* spp. que causa a bartonelose ou Doença de Carrión, e alguns vírus como *Phlebovirus*, causadores da febre dos flebotomíneos e de outras arboviroses (BATES et al., 2015; MAROLI et al., 2013). Além disso, estes insetos são capazes de albergar outros tripanosomatídeos como *Trypanosoma* e *Endotrypanum* (CUPOLILLO, 2000).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos e seu desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estádios larvais, pupa e adulto. São pequenos, raramente excedem 3,5 mm de comprimento, possuem o corpo coberto de pêlos e sua coloração varia do branco ao preto dependendo da espécie. Apresentam um par de asas que confere saltos curtos e quando em repouso ficam em posição semi-ereta (KILLICK-KENDRICK, 1999). Geralmente são encontrados em locais úmidos e escuros, onde o microclima é favorável para a sua sobrevivência, tais como, cavernas, fissuras em paredes, rochas, tronco de árvores, tocas de roedores e abrigo de animais como estábulos, galinheiros e pocilgas (CARVALHO et al., 2013; CASANOVA et al., 2013; SOUZA et al., 2014).

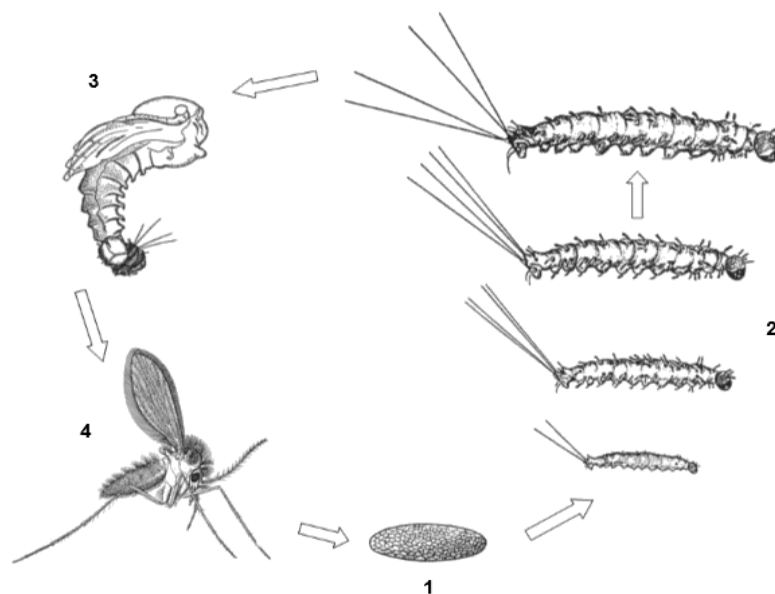
Os adultos de ambos os sexos, se alimentam de seiva vegetal e apenas as fêmeas são hematófagas, sendo o alimento importante para maturação dos ovos, embora algumas espécies sejam capazes de produzir ovos viáveis sem o repasto sanguíneo (BRAZIL; OLIVEIRA, 1999). Possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia e algumas espécies também possuem hábitos matutinos e vespertinos (SHARMA; SINGH, 2008).

Alguns estudos indicam que espécies silvestres podem se dispersar a distâncias mais curtas do que as do peridomicílio, em geral cerca de 300m, de maneira que as atividades adultas são geralmente restritas à vizinhança de criadouros de larvas. No entanto, algumas espécies peridomiciliares podem se dispersar por até 2,2 km (KILLICK-KENDRICK et al., 1984; RIOUX et al., 1979). A atividade sazonal dos flebotomíneos adultos é influenciada por diversos fatores abióticos como temperatura, umidade e pluviosidade (CASANOVA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012). O ciclo de desenvolvimento dos flebotomíneos ocorre em cerca de 30 a 40 dias (Figura 2) e nenhuma das etapas ocorre em ambientes aquáticos, o que os distingue de outros dípteros hematófagos, como os mosquitos. As fêmeas depositam os ovos isolados ou em pequenos conjuntos no solo úmido rico em matéria orgânica. O período de incubação pode variar de acordo com a espécie e com diversos fatores externos, mas em

geral, as larvas eclodem no período de 7 a 10 dias e podem sofrer diapausa desencadeada por condições ambientais extremas, como temperaturas quentes ou frias, ambientes secos ou com fotoperíodo mais curto (KILLICK-KENDRICK, 1978). Os ovos possuem 0,3 a 0,5 mm de comprimento, possuem forma ovóide ou elipsóide, são inicialmente brancos ou cinzas, porém, se transformam em marrom ou preto dentro de algumas horas de oviposição (VOLF; VOLFOVA, 2011).

As larvas desenvolvem seus quatro estádios em aproximadamente três semanas e se diferenciam morfológicamente pelo tamanho e número de cerdas caudais. As larvas de primeiro estágio possuem um par de cerdas, enquanto que o segundo a quarto estágios possuem dois pares de cerdas. Se locomovem com movimentos ondulatórios a procura de alimento, que se compõe basicamente de matéria orgânica. Cerca de um ou dois dias antes de mudar para a fase de pupa, a quarta fase larval deixa de se alimentar e procura algum suporte sólido que serve de substrato para a fixação da pupa através da última exúvia larval, um período que pode perdurar por 7 a 12 dias até a emergência do adulto (LAWYER; PERKINS, 2004). Após a oviposição as fêmeas morrem (VOLF; VOLFOVA, 2011).

Figura 2 - Ciclo evolutivo dos flebotomíneos.



Fonte: adaptado de Lawyer e Perkins (2004).

Nota: 1. Ovo; 2. Quatro estádios larvais; 3. Pupa; 4. Adulto.

2.4 Flebotomíneos como vetores de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Diversas espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão de *L. (L.) infantum* no Velho Mundo, tais como: *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. argentipes*, *P. ariasi* e *P. neglectus* (READY, 2010). No Novo Mundo, *L. longipalpis* é comprovadamente o vetor da LV (LAINSON et al., 1977), onde apresenta ampla distribuição geográfica coincidente com os focos da doença, hábito alimentar eclético e antropofílico (LAINSON; RANGEL, 2003; 2005), além da habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos, incluindo àqueles resultantes de ação antrópica (RANGEL; VILELA, 2008; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Contudo, o papel vetorial de outras espécies em áreas endêmicas também tem sido discutido, principalmente onde a presença do vetor primário não é confirmada (CARVALHO et al., 2007, 2010; PITA-PEREIRA et al., 2008; SALOMÓN et al., 2010; SOUZA et al., 2003). No estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, *L. cruzi* e *L. forattinii* foram consideradas como potenciais vetoras da LV (PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998), devido aos achados de infecção natural associados a antropofilia das espécies. Ainda neste estado, na Serra da Bodoquena, *L. almerioi* juntamente com *L. longipalpis* pode está atuando na transmissão do parasito (SAVANI et al., 2009). Adicionalmente, *L. cortelezzii* no Estado de Minas Gerais e *L. evansi* na Colômbia e na Venezuela também são espécies que podem estar envolvidas no ciclo de transmissão de *L. (L.) infantum* (CARVALHO et al., 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Estudos realizados no Brasil apresentaram evidências epidemiológicas da participação de *L. migonei* como vetor (CARVALHO et al., 2007, 2010; SOUZA et al., 2003). Em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte de Pernambuco, devido a predominância de *L. migonei* na fauna local, como em habitações e abrigos de animais no peridomicílio, a espécie foi sugerida como possível transmissora do parasito (CARVALHO et al., 2007). Posteriormente, o encontro de infecção natural associada a sua antropofilia reforçaram as evidências da sua participação no ciclo epidemiológico da LV nesta área (CARVALHO, et al., 2010). No Rio de Janeiro, Souza et al. (2003), não observaram a presença de *L. longipalpis* em seis áreas de ocorrência de casos autóctones da doença. Nesta ocasião, os autores sugeriram a importância epidemiológica de *L. migonei* na transmissão da LV. Aspectos epidemiológicos desta espécie também foram estudados na Argentina, em área de transmissão da doença, na qual foi relatada a elevada densidade de *L. migonei* associada a casos humanos e caninos no ambiente peridomiciliar (SALOMÓN et al., 2010). Recentemente, Moya et al. (2015) relataram a

infecção natural da espécie evidenciando a importância de estudos que definam o papel de *L. migonei* como vetor específico ou permissivo de *L. (L.) infantum*.

L. migonei é uma espécie com ampla distribuição geográfica na América do Sul, inclusive no Brasil, onde pode ser encontrada tanto em ambientes silvestres quanto nos domicílios e abrigos de animais, com capacidade de adaptação a ambientes que sofreram intensa ação antrópica (AZEVEDO; RANGEL, 1991; FORATTINI et al., 1973; GUIMARÃES et al., 2012; RANGEL; LAINSON, 2009). Além disso, a espécie é altamente antropofílica, sendo considerada uma espécie eclética por se alimentar de uma variedade de animais (AGUIAR et al., 1987; FORATTINI et al., 1973). Ademais, *L. migonei* é vetor comprovado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Brasil (NIEVES; PIMENTA, 2000) e na Venezuela (GRIMALDI Jr.; TESH, 1993).

Segundo Killick-Kendrick (1990), a capacidade de um flebotomíneo atuar como um vetor é determinada pelo sucesso do desenvolvimento do parasito no interior do tubo digestivo do inseto, que depende de sua habilidade em superar as barreiras existentes no intestino médio do flebotomíneo, tais como, resistir à ação de enzimas digestivas, ter capacidade de atravessar a matriz peritrófica (MP), assim como de se aderir às células epiteliais do intestino médio. Além disso, o desempenho de determinadas espécies de flebotomíneos em relação à sua incriminação como vetor, implica não apenas na sua habilidade de completar a metaciclo-gênese do parasito, mas também de ser capaz de realizar a sua transmissão para os hospedeiros.

No entanto, a transmissão de *Leishmania* spp. aos hospedeiros suscetíveis é de difícil demonstração prática. De acordo com Maroli et al. (2013), tais critérios devem estar inseridos em um contexto epidemiológico, de maneira que exista uma relação entre a distribuição geográfica do vetor e o registro de casos humanos da doença, bem como a comprovação da antropofilia da espécie e da capacidade do vetor em suportar a infecção com a mesma espécie do parasito que ocorre em humanos.

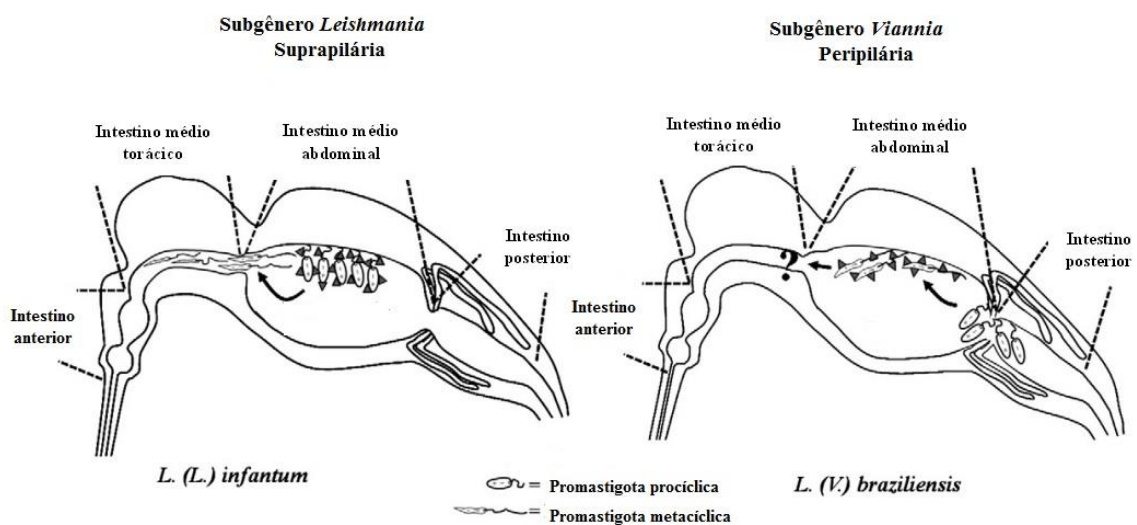
Recentemente, dois novos critérios envolvendo modelagem matemática foram propostos para a incriminação de flebotomíneos vetores. De acordo com Ready (2013), é necessário demonstrar que o flebotomíneo é essencial para manter a transmissão com ou sem o envolvimento de outros vetores e que a incidência da doença diminui significativamente com a diminuição na densidade do vetor específico.

2.5 Ciclo biológico de *Leishmania* spp

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida que envolve diferentes formas de desenvolvimento. Estas formas representam adaptações às condições ambientais que ocorrem dentro dos hospedeiros vertebrados e invertebrados (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001). O parasito apresenta dois estágios no seu ciclo de vida: promastigotas, células alongadas com motilidade flagelar, encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos, e amastigotas, células intracelulares, ovóides, imóveis, encontradas em fagócitos mononucleares dos hospedeiros vertebrados (CUPOLILLO et al., 2000; MUYLDER et al., 2011).

As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se nas regiões abdominal e torácica do intestino médio (seção Suprapilária) e, posteriormente, migram para o intestino anterior, onde podem ser transmitidos aos hospedeiros vertebrados. As espécies do subgênero *Viannia*, estabelecem uma infecção inicial na porção posterior do trato digestivo, na região do piloro (seção Peripilária) antes de migrar para o intestino médio abdominal e, em seguida, para o intestino anterior para serem transmitidos (Figura 3) (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; LAINSON; SHAW, 1987).

Figura 3 - Diferentes formas de desenvolvimento de *Leishmania* no flebotomíneo.

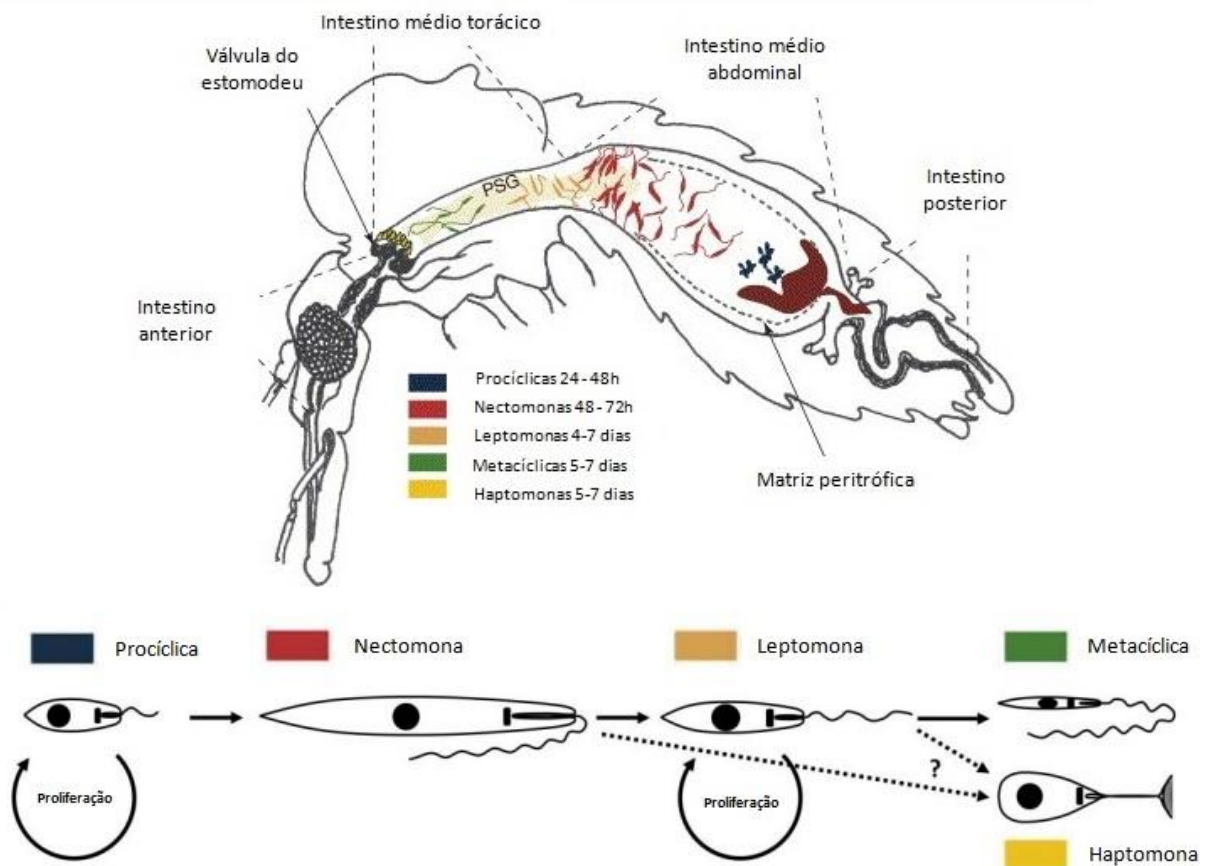


Fonte: adaptado de Assis et al. (2012)

No presente estudo, é demonstrado apenas o ciclo biológico dos parasitos com comportamento suprapilárico, uma vez que *L. (L.) infantum* é o objeto da pesquisa e possui este padrão de desenvolvimento.

O ciclo se inicia quando a fêmea de flebotomíneo realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. As fêmeas utilizam as suas peças bucais para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos, formando poços de sangue no qual elas se alimentam. Durante este processo conhecido por telmatofagia, são ingeridos macrófagos parasitados por formas amastigotas. Os macrófagos se rompem e liberam as amastigotas que, em seguida, devido a alterações no intestino do flebotomíneo, como diminuição da temperatura e aumento do pH, se transformam em promastigotas que passarão por diferentes fases à medida que migram do intestino médio para o anterior (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Cada uma destas fases é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais destinadas a garantir o seu requerimento nutricional, crescimento, habilidade de se dividirem, expressão de moléculas de superfície, bem como a sobrevivência do parasito no trato digestivo do vetor (Figura 4) (KAMHAWI, 2006; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Figura 4- Ciclo biológico de *Leishmania* spp. no vetor.



Fonte: Adaptado de Bates e Rogers (2004), Gossage, Rogers e Bates (2003) e Kamhawi (2006).

Diversos estudos têm utilizado diferentes denominações para as formas promastigotas (LAWYER et al., 1990; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; BATES; ROGERS, 2004). No presente estudo, foram utilizadas as denominações propostas por Gossage, Rogers e Bates (2003).

Primeiramente, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, forma curta e levemente móvel que inicia o ciclo de proliferação no vetor. Estas formas são confinadas pela matriz peritrófica (MP), secretada por células que revestem o epitélio intestinal de um grande número de insetos hematófagos, composta por proteínas, glicoproteínas e quitina (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; PIMENTA et al., 1997; PRUZINOVA et al., 2015). No período de 24 a 48h, as procíclicas proliferam e diferenciam-se em promastigotas nectomonas, forma delgada e altamente móvel. A desintegração da MP ocorre 3 dias após o repasto sanguíneo devido a quitinases liberadas pelo parasito (SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990) e pelo vetor (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2005), o que proporciona a adesão das nectomonas ao epitélio intestinal. Tanto o não escape da matriz, quanto a não adesão à parede do epitélio faz com que os parasitos sejam eliminados ao fim da digestão do sangue pelo inseto. Esta adesão das promastigotas ao epitélio do trato digestivo do flebotomíneo é proporcionada pelo lipofosfoglicano (LPG) (PIMENTA et al., 1994; SACKS et al., 1984; SARAIVA et al., 1995).

Durante a migração das nectomonas para o intestino médio torácico, que ocorre 4 a 5 dias após o repasto sanguíneo, elas originam formas curtas e largas denominadas promastigotas leptomonas, a segunda forma promastigota replicativa, que aumenta o número de parasitos e são responsáveis pela produção do PSG (promastigote secretory gel), que desempenha um papel fundamental na transmissão, provocando um grande acúmulo de parasitos na válvula do estomodeu (BATES; ROGERS, 2004; BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001).

No período de 5 a 7 dias após o repasto sanguíneo surgem as promastigotas haptomonas, formas imóveis que possuem um flagelo modificado com o qual podem se ligar a válvula do estomodeu por meio de estruturas tipo hemidesmossomos e promover a sua degeneração através da secreção de quitinases (VOLF et al., 2004). A forma precursora das haptomonas ainda é discutida, nectomonas ou leptomonas, mas devido ao seu tamanho, forma e tempo de aparecimento é mais provável que elas diferenciam-se a partir das leptomonas, assim como as promastigotas metacíclicas (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). As formas metacíclicas infectantes são altamente ativas e migram ao longo do intestino anterior,

possibilitando a sua transmissão (BATES, 2007; SACKS et al., 1995; SARAIVA et al., 1995).

A disfunção da válvula do estomodeu promovida pelas promastigotas haptomonas faz com que ela permaneça por mais tempo aberta. Desta forma, o inseto ao realizar o repasto sanguíneo, regurgita uma parte do conteúdo intestinal, carreando os parasitos presentes na porção anterior do trato digestivo, infectando o hospedeiro vertebrado (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992). No hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e transformam-se nas formas amastigotas, capazes de multiplicarem-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo das células fagocitárias (CHANG; FONG; BRAY, 1985). As amastigotas se multiplicam por divisão binária, até provocarem o rompimento da célula. Os parasitos livres são então fagocitados por novos macrófagos, e disseminados pelo organismo (ASHFORD, 2000).

2.6 Barreiras naturais ao desenvolvimento de *Leishmania* no vetor

Para completar o seu desenvolvimento nos flebotomíneos, o parasito deve ser capaz de superar algumas barreiras que dificultam a infecção, tais como, as enzimas digestivas no intestino que podem promover a morte dos parasitos, a MP, que pode se comportar como barreira física permitindo o escape do parasito para fora do intestino médio, a excreção do sangue digerido, que pode resultar em perda de infecção do intestino médio (subgênero *Leishmania*), as reações do sistema imune, a anatomia e fisiologia do intestino anterior, que pode impedir a fixação de *Leishmania* no epitélio do intestino médio, a migração anterior e a regurgitação de promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo no tecido do hospedeiro (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KILLICK-KENDRICK, 1990; SACKS; KAMHAWI, 2001; VOLF et al., 2014).

2.6.1 Enzimas digestivas

As enzimas digestivas representam a primeira e uma das barreiras mais significativas para a sobrevivência do parasito no intestino médio de flebotomíneos. A produção das proteases, principalmente tripsina e quimiotripsina por células epiteliais do intestino médio, inicia após o repasto sanguíneo e apresentam níveis significativos no período de 18-48 horas, dependendo da espécie de flebotomíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001; PRUZINOVA et al., 2015; RAMALHO-ORTIGÃO; SARAIVA; TRAUB-CSEKO, 2010).

Diversos estudos têm revelado que a atividade das proteases influenciam o desenvolvimento de *Leishmania* e a competência vetorial dos flebotomíneos (BOROVSKY; SCHLEIN, 1987; PIMENTA et al., 1997). Em estudo pioneiro, Adler (1938) utilizou *P. papatasi* para avaliar a digestão de sangue nas fases iniciais de infecção, período o qual corresponde a atividade proteolítica, e observou que, com a diminuição da porcentagem de soro no sangue, a taxa de infecção aumentou em espécies que normalmente não infectam este vetor. Este aumento seria devido à diminuição dos componentes do soro que induzem proteases. Desta forma, foi sugerido que os produtos da digestão eram os responsáveis pela destruição dos parasitos.

Similarmente, estudo realizado com *L. (L.) donovani* em *P. papatasi* revelou que apenas 5% dos parasitos no intestino médio sobreviveram quando o sangue total foi utilizado na alimentação artificial. Por outro lado, este número aumentou para 70% quando os insetos foram alimentados apenas com amastigotas, eritrócitos e solução salina. O aumento da sobrevivência dos parasitos foi correlacionado com a diminuição dos níveis de atividade das proteases (SCHLEIN; JACOBSON, 1998).

Além disso, outros estudos demonstraram que, mesmo utilizando parasitos e vetores competentes como *P. papatasi* e *L. (L.) major*, cerca de 50% da quantidade inicial das formas amastigotas foram mortas no primeiro dia após o repasto sanguíneo (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; WALTERS, 1993). Esta morte precoce dos parasitos também foi observada em espécies do Novo Mundo, tais como, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* durante o desenvolvimento em *L. migonei* (NIEVES; PIMENTA, 2002), e *L. (L.) mexicana* no intestino de *L. longipalpis* (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002).

Recentemente, Pruzinova et al. (2015) compararam a atividade proteolítica em quatro espécies de flebotomíneos durante o desenvolvimento de *L. (L.) donovani* e observaram que os picos de atividade da tripsina nas espécies refratárias *P. papatasi* e *S. schwetzi* foram

maiores do que nas espécies susceptíveis (*P. argentipes* e *P. orientalis*), reforçando a hipótese de que a tripsina influencia o desenvolvimento de *Leishmania* em flebotomíneos.

Vários estudos têm demonstrado que, a reduzida atividade proteolítica no intestino médio do vetor, a partir da adição de inibidor de tripsina ao sangue, é capaz de promover a sobrevivência de *L. (L.) donovani* no estágio inicial de infecção em *P. papatasi* (BOROVSKY; SCHLEIN, 1987) e *L. (L.) mexicana* durante o desenvolvimento em *L. longipalpis* (ROGERS et al., 2008).

As espécies de *Leishmania* evoluíram estratégias para inibir ou retardar o nível e o tempo de atividade proteolítica no intestino médio de flebotomíneos como mecanismo para superar os efeitos prejudiciais de enzimas digestivas e completar o seu desenvolvimento no vetor (SACKS; KAMHAWI, 2001). Schlein e Romano (1986) e Dillon e Lane (1993) demonstraram que promastigotas diferenciadas de *L. (L.) major* foram mais resistentes à morte do os que parasitos em estágio inicial, devido à habilidade em retardar e diminuir o pico de atividade da tripsina e aminopeptidase no intestino de *P. papatasi*. Adicionalmente, outros estudos têm demonstrado uma diminuição na atividade da tripsina no intestino de *L. longipalpis* quando infectado por *L. (L.) mexicana* (SANT'ANNA et al., 2009) e *L. (L.) infantum* (TELLERIA et al., 2010).

Adicionalmente, estudos têm revelado que em combinações de vetores e parasitos compatíveis, *Leishmania* é capaz de modular os níveis de enzimas digestivas do inseto, tanto no nível de proteína quanto transcricional (DOSTÁLOVÁ et al., 2011; SCHLEIN; ROMANO, 1986; TELLERIA, 2010). Recentemente, Santos et al. (2014) demonstraram que *L. (L.) infantum* durante desenvolvimento em *L. longipalpis* modula a atividade da tripsina, supostamente diminuindo o pH do intestino médio.

Apesar dos numerosos estudos relacionados com a susceptibilidade de *Leishmania* às enzimas digestivas, há poucas informações sobre a regulação da sua expressão pelos flebotomíneos e como elas são moduladas nas infecções. De modo geral, estas enzimas são um dos fatores críticos que influenciam a competência vetorial dos flebotomíneos e representam alvos atraentes para estudos de bloqueio de transmissão em vetores.

2.6.2 Matriz peritrófica (MP)

A segunda potencial barreira para a infecção por *Leishmania* é a MP, um envoltório acelular semi-permeável que separa o sangue ingerido do epitélio do intestino médio e compartimentaliza a digestão entre os espaços endo e ectoperitrófico. Esta estrutura é composta por quitina, proteínas e glicoproteínas, e desempenha um papel fundamental na proteção do epitélio do intestino médio de agentes patogênicos, químicos e danos mecânicos (LEHANE, 1997; PIMENTA et al., 1997). Em mosquitos e outros insetos hematófagos, a MP realiza um importante papel na desintoxicação de heme (PÁSCOA et al., 2002) e o seu rompimento afeta a fecundidade das fêmeas de flebotomíneos (ARAÚJO et al., 2012).

A MP é secretada pelo epitélio intestinal em resposta a distensão do intestino promovida pelo repasto sanguíneo, de maneira que em poucas horas o sangue é envolvido por uma MP fina composta principalmente por fibras de quitina. Posteriormente, dependendo da espécie de flebotomíneo, cerca de 12h a 48h após o repasto sanguíneo a estrutura torna-se mais espessa e amadurece. As proteínas e glicoproteínas são incorporadas na sua composição e, com cerca de 72h, a MP tem o aspecto enrugado e inicia a desintegração (SÁDLOVÁ; VOLF, 2009; SECUNDINO et al., 2005; WALTERS et al., 1993).

Vários estudos sugerem um papel duplo para MP de flebotomíneos em relação ao desenvolvimento de *Leishmania*: proteger os parasitos contra a degradação proteolítica durante a fase de transição da forma amastigota para promastigota (PIMENTA et al., 1997), e agir como uma barreira à colonização do intestino que deve ocorrer antes da eliminação do bolo fecal (BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SÁDLOVÁ; VOLF, 2009).

O importante papel da desintegração da MP tem sido atribuído às quitinases derivadas do flebotomíneo e/ou parasito. Pimenta et al. (1997) observaram que o bloqueio da formação da MP em *P. papatasi* através da adição de quitinase ocasionou um aumento do número de parasitos mortos de *L. (L.) major* em algumas horas. A mortalidade precoce do parasito foi revertida pela adição do inibidor de tripsina, sugerindo que a MP cria uma barreira para a rápida difusão de enzimas digestivas e limita a exposição de parasitos durante o tempo em que eles são vulneráveis aos danos proteolíticos.

Por outro lado, em fases posteriores a MP parece atuar como uma barreira para o desenvolvimento do parasito. Walters et al. (1993) relataram aprisionamento de *L. (V.) panamensis* no espaço endoperitrófico de *P. papatasi*. O fracasso do parasito para escapar da MP resultou em sua expulsão do intestino médio. Pimenta et al. (1997) demonstraram ainda

que a adição de alosamidina, um inibidor da quitinase, levou ao espessamento da MP, que se sustentou intacta por mais tempo e promoveu o aprisionamento de *L. (L.) major* dentro do espaço endoperitrófico evitando o estabelecimento da infecção em *P. papatasi*.

Schlein, Jacobso e Schlomai (1991) propuseram pela primeira vez que a fuga de *Leishmania* da MP é realizada por um quitinase produzida por promastigotas e sugeriram que *L. (L.) major* poderiam causar a desintegração da porção anterior da MP de *P. papatasi*, permitindo o escape do parasito. Outro estudo reforçou esta hipótese ao demonstrar que a super expressão de quitinase de *L. (L.) mexicana* promoveu o escape do parasito da MP em *L. longipalpis* (ROGERS et al., 2008). Para Ramalho-Ortigão et al. (2005), estes resultados associados a elevada atividade enzimática de *P. papatasi* e *L. longipalpis* observadas após repasto sanguíneo sugerem que o escape do parasito da MP é promovido pelos efeitos de quitinases produzidas tanto pelo vetor quanto pelo parasito.

Entretanto, mais recentemente, Sádlová e Volf (2009) sugeriram que a quitinase produzida por *L. (L.) major* não possui um papel importante na desintegração da MP em *P. duboscqi*. Os autores demonstraram que os parasitos permanecem no espaço intraperitrófico até que a MP seja desintegrada por quitinases provenientes do vetor e, posteriormente, colonizam o espaço ectoperitrófico do intestino médio. Além disso, os autores revelaram que a desintegração coincide com o período de transformação das promastigotas procíclicas em nectomonas, que são capazes de se ligarem ao epitélio do intestino e evitar a defecação com o sangue ingerido. Esta transformação está associada com a difusão de moléculas sinalizadoras do espaço ectoperitrófico para o parasito migrar através da ruptura da MP.

A contribuição dos vetores e parasitos na secreção de quitinases que proporcionam a degradação da MP precisa ser mais bem elucidada, pois podem fornecer as informações necessárias para o entendimento dos mecanismos de escape do parasito. Além disso, o processo de formação e desintegração da MP em insetos hematófagos é altamente específico da espécie (LEHANE, 1997) e, possivelmente, é um dos principais fatores envolvidos na competência vetorial dos flebotomíneos.

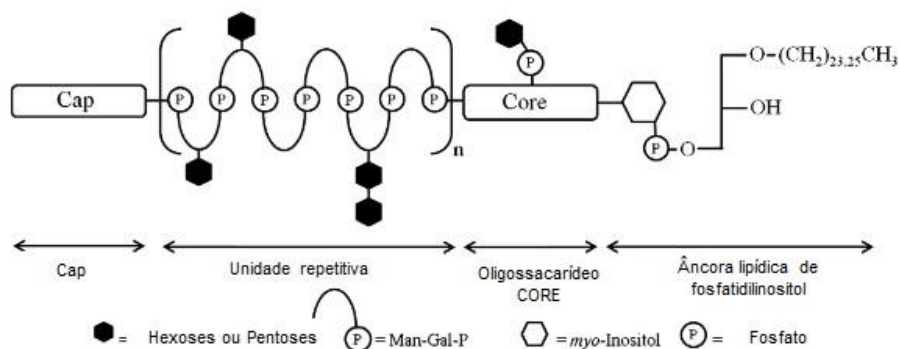
2.6.3 Fixação dos parasitos ao epitélio intestinal

Com a desintegração da MP durante o estágio tardio da infecção, os parasitos precisam se ligar ao epitélio intestinal para evitar a eliminação com o resto do sangue digerido. Para tanto, após o escape do espaço endoperitrófico, as promastigotas inserem os flagelos entre as microvilosidades do epitélio do intestino médio (BATES, 2008; KAMHAWI, 2006; MYSKOVA et al., 2007; WILSON et al., 2010). Desta forma, tem sido postulado que esta ligação é o principal determinante da especificidade vetor-parasito (PIMENTA et al., 1994; SACKS, 2000).

Baseado em estudos experimentais, devido a capacidade do vetor em suportar o desenvolvimento de uma ampla variedade ou a determinada espécie de *Leishmania*, os flebotomíneos tem sido classificados como permissivos ou específicos (VOLF; MYSKOVA, 2007). Neste sentido, diversos estudos têm investigado o papel do lipofosfoglicano (LPG) em mediar a adesão dos parasitos ao intestino médio dos flebotomíneos (DOBSON et al., 2010; MYSKOVA et al., 2007; SACKS; KAMHAWI, 2001).

O LPG é um glicolípido abundante que reveste toda a superfície, incluindo o flagelo de todas as fases promastigotas de *Leishmania* e sua estrutura básica é altamente conservada em todas as espécies. O LPG consiste de quatro domínios distintos: uma âncora lipídica de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) seguida por uma parte central “core” formada por um núcleo de heptassacarídeo, uma região com um polímero de 10-30 unidades repetitivas de dissacarídeos fosforilados (P) terminados por um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo “cap” (Figura 5) (TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

Figura 5- Estrutura bioquímica do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*.



Fonte: adaptado de Assis et al. (2012)

As evidências do papel do LPG foram obtidas utilizando *L. (L.) major* mutantes de *P. papatasi* que não possuem o gene que codifica o LPG1 galactofuranosiltransferase necessário para a síntese do núcleo de glicano, tornando as células deficientes em LPG. Desta forma, a capacidade do parasito em persistir no intestino médio foi completamente perdida após a excreção do bolo fecal, e esta perda foi correlacionada com a incapacidade das promastigotas em se ligarem as células epiteliais do intestino médio *in vitro* (SACKS, 2000). Similarmente, Svarosvka et al. (2010) obtiveram os mesmos resultados ao avaliar os mutantes de *L. (L.) major* em *P. duboscqui*.

Polimorfismo nos LPGs tem sido demonstrado e variam na composição e na frequência dos açúcares, tais como manose, galactose ou glicose das cadeias laterais de diferentes espécies de *Leishmania* (SACKS et al., 1994, 1995; MAHONEY et al, 1999). O LPG de *L. (L.) donovani* proveniente da Índia possui as repetições de PG modificadas com resíduos de glicose, enquanto que o do Sudão, não possui cadeias laterais (SACKS et al. 1995; MAHONEY et al., 1999). Variabilidade intra-específica do LPG tem sido observada também entre espécies de *L. (L.) infantum* obtidas de diferentes isolados. Em *L. (L.) mexicana*, o LPG contém β -glicoses (SOARES et al., 2002), em *L. (L.) major* 1-4 β -galactoses frequentemente com arabinose terminal (MCCONVILLE et al., 1990) e *L. (V.) braziliensis* não possui cadeias laterais (SOARES et al., 2005). Esta variabilidade inter e intra-específica do LPG está relacionada à seletividade, permissividade e sua função como ligante do parasito aos receptores do intestino e pode explicar a competência vetorial espécie-específica (DOBSON et al., 2010; VOLF et al., 2014).

Além do polimorfismo estrutural entre as espécies de *Leishmania*, a variabilidade também ocorre entre as formas do parasito. Durante a metaciclogênese, o LPG das promastigotas metacíclicas sofre modificações, tornando-se estruturalmente mais alongados, com maior número de resíduos das cadeias laterais quando comparado com as promastigotas procíclicas, revelando um papel importante na infectividade do parasito (SACKS et al., 1995).

Pimenta et al. (1994) demonstraram a ligação *in vitro* do LPG purificado de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* durante o desenvolvimento em *P. argentipes* e sugeriram que o intestino médio do vetor possui um receptor para uma parte conservada do LPG, representando a ampla permissividade para várias espécies de *Leishmania*. Posteriormente, foi sugerido que a ligação de *L. (L.) donovani* em *P. argentipes* ocorre através de receptores para sacarídeos neutros que são mascarados pelas alterações conformacionais nas cadeias PG de promastigotas metacíclicas da espécie, revelando que, devido às variações

exibidas nas cadeias laterais do LPG, é pouco provável a existência de um receptor comum (SACKS et al., 1995).

Recentemente foi observado o desenvolvimento de *Leishmania* independente de LPG em quatro vetores permissivos para *L. (L.) major*: *P. arabicus*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* e *L. longipalpis*. Os parasitos isentos de LPG sobreviveram e desenvolveram infecções comparáveis ao tipo selvagem nestas espécies de flebotomíneos (SVAROVSKA et al., 2010; MYSKOVA et al., 2007). Da mesma forma, Rogers et al. (2004) relataram que *L. (L.) mexicana* mutantes em LPG1 sobrevivem e completam o seu desenvolvimento em *L. longipalpis*.

Para Myskova et al. (2007) o LPG é necessário em vetores específicos, enquanto que, em vetores permissivos, o parasito se liga através de um mecanismo independente de LPG. Os autores observaram a ocorrência de N-acetilgalactosamina (GalNAc) nos glicoconjugados do intestino médio de *P. halezensis* durante estudo *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) major* e sugeriram que estas moléculas funcionam como ligantes para *Leishmania*. Para tanto, os autores propuseram que o parasito exhibe um receptor de heparina, anteriormente descrito na superfície de várias espécies de *Leishmania*, e que realizam o papel de fixação do parasito no intestino médio de flebotomíneos (SVOBODOVA; BATES; VOLF, 1997).

Embora o papel do LPG de *L. (L.) major* em *P. papatasi* e *P. dubosqi* tenha sido provado inequivocamente, demonstrando a sua importância para a competência vetorial de flebotomíneos, os mecanismos de fixação do parasito, os receptores no intestino do vetor, bem como a liberação do parasito na fase posterior da infecção ainda necessitam ser mais bem esclarecidos em outras espécies de flebotomíneos.

2.6.4 Sistema imune

Nos insetos, a resposta imune desempenha um papel importante na manutenção da homeostase no intestino e na eliminação de patógenos (TELLERIA et al., 2013). Em flebotomíneos, os poucos estudos direcionados às reações da resposta imune têm identificado defensinas e peptídeos catiônicos anti-bacterianos como os principais componentes da resposta inata (BOULANGER; BULET; LOWENBERGER, 2006; TELLERIA et al., 2013).

Boulanger, Bulet e Lowenberger (2006) ao estudar defensina em *P. dubosqui* observaram que o peptídeo recombinante exibiu uma significativa atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *L. (L.) major in vitro*. No entanto, em *L. longipalpis*, a produção de defensina foi induzida por *L. (L.) mexicana* e revelou uma superexpressão 48h

após a alimentação e um decréscimo após 72h. Os autores concluíram que o aumento na expressão inicial de defensina pode ser uma resposta à proliferação de *Leishmania* no intestino. Desta forma, a elevada carga parasitária foi correlacionada a baixa expressão de defensinas, o que permitiu a sobrevivência e a multiplicação do parasito (TELLERIA et al., 2013).

Análises de expressão de transcritos têm revelado outros possíveis componentes da resposta imune inata no intestino de *P. papatasi* e *L. longipalpis* como um padrão de reconhecimento de proteínas (PITALUGA et al. 2009; RAMALHO-ORTIGÃO et al. 2007). O papel destas proteínas e da imunidade na infecção por *Leishmania* em flebotomíneos precisam ser melhor elucidados, uma vez que estudos indicam que diferentes espécies de *Leishmania* podem provocar diversas respostas imunológicas.

2.6.5 Migração dos parasitos para região anterior e sua regurgitação durante repasto sanguíneo

O estágio final de desenvolvimento de *Leishmania* no vetor envolve a diferenciação dos parasitos na forma metacíclica e a sua regurgitação na pele do hospedeiro vertebrado. As formas metacíclicas são encontradas próximas à válvula do estomodeu e são altamente móveis e livres para migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a probóscide, possibilitando a transmissão (BATES, 2007).

Os mecanismos que desencadeiam a metaciclogênese *in vivo* são pouco conhecidos, no entanto, sabe-se que a metaciclogênese *in vitro* é induzida pelo baixo pH, condições anaeróbicas e um decréscimo nos níveis de tetrahydrobiopterina (um co-factor essencial para a atividade catalítica da enzima óxido nítrico sintase), que atua como um sinal para a diferenciação nas formas metacíclicas (BATES, 2008; CUNNINGHAM et al., 2001; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

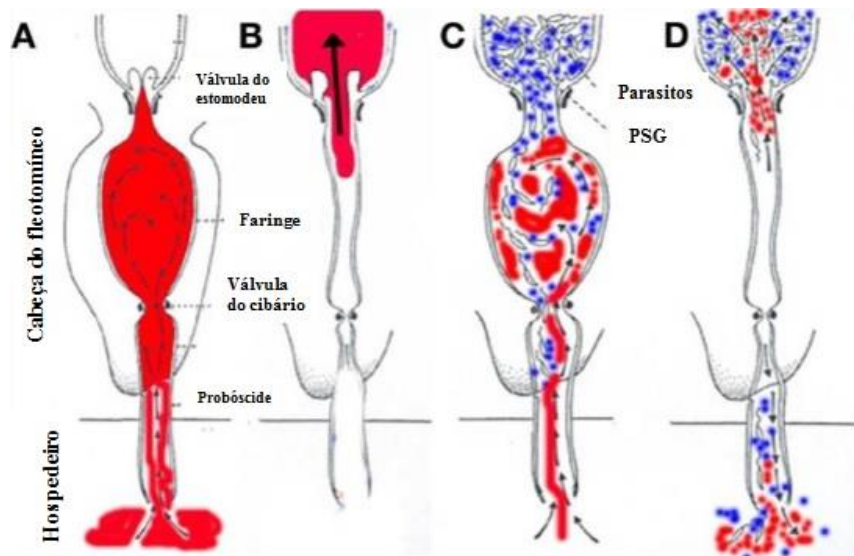
Um aspecto importante da fase final de infecção é a produção do *promastigote secretory gel* (PSG) por promastigotas leptomonas. O PSG é uma matriz gelatinosa densa constituída principalmente por proteofosfoglicanos (fPPG), uma glicoproteína de alto peso molecular, a maior molécula secretada por *Leishmania* spp., que representa o componente ativo do PSG (ROGERS, 2012) e que se acumula no intestino anterior envolvendo os parasitos (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2007; ROGERS; BATES, 2007).

Durante o repasto sanguíneo, o plug do PSG exerce pressão sobre a válvula do estomodeu, e como resultado, tende a ficar permanentemente aberta (ROGERS, 2012; ROGERS; BATES, 2007) permitindo a regurgitação do PSG, parasitos e saliva com o repasto sanguíneo. Além disso, quitinases secretadas pelos parasitos contribuem para o dano da válvula do estomodeu (SCHLEIN et al., 1992; VOLF et al., 2004), promovendo a sua disfunção e prejudicando a ingestão de sangue.

Estudos recentes têm investigado o papel do PSG na transmissão de *Leishmania* (ROGERS et al., 2004; ROGERS; BATES, 2007; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002). Rogers et al. (2004) demonstraram que promastigotas metacíclicas de *L. (L.) mexicana* são regurgitadas do intestino médio de flebotomíneos juntamente com PSG e eliminadas com a saliva durante a picada. Adicionalmente, foi observado que o PSG atua como um potente fator de virulência capaz de recrutar neutrófilos e macrófagos para o local da picada, exacerbando a infecção (BATES; ROGERS, 2004; ROGERS et al., 2004; ROGERS et al., 2009; SACKS; KAMHAWI, 2001).

No flebotomíneo não infectado o sangue é bombeado através da probóscide para a faringe e, posteriormente, para o intestino médio através da válvula do estomodeu (Figura 6A e 6B). No entanto, no flebotomíneo infectado o plug do PSG conecta-se a válvula do estomodeu e impede a absorção sanguínea imediata no intestino médio, de modo que o sangue se mistura com o parasito e o PSG na faringe antes de ser regurgitado novamente (Figuras 6C e 6D).

O acúmulo do PSG altera o comportamento alimentar dos flebotomíneos, tornando maior o tempo do repasto sanguíneo, bem como o número de tentativas de picada, aumentando a possibilidade de transmissão do parasito (ROGERS et al., 2002; ROGERS; BATES, 2007). Rogers et al. (2009) demonstraram que fPPG determina não só o comportamento alimentar, mas também o número de parasitos transmitidos. O aumento do tempo de alimentação foi positivamente correlacionado com o número de formas promastigotas metacíclicas e a quantidade de PSG regurgitado. Portanto, o bloqueio e a manipulação da alimentação coincidem com um pico da metaciclogênese no vetor, que é essencial para o sucesso na transmissão.

Figura 6 – Alterações na alimentação dos flebotomíneos devido ao plug de PSG.

Fonte: adaptado de Rogers (2012)

Nota: Mecanismo de alimentação de fêmea de flebotomíneo não infectada (A e B) e infectada (C e D).

Adicionalmente, a saliva também exerce um papel importante na transmissão de *Leishmania* através das suas propriedades vasodilatadoras, antiplaquetária e anti-hemostáticas que facilitam a alimentação sanguínea, inibem a coagulação do sangue, modulam a resposta imunológica, exacerbam a infecção e induzem a infecciosidade do parasito para o hospedeiro vertebrado (ROGERS, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que o maxadilan, um vasodilatador presente na saliva de *L. longipalpis* atua na exarcebação da infecção ao inibir a ação dos macrófagos, além de aumentar o fluxo sanguíneo proporcionando a aceleração e otimização do repasto sanguíneo e o prolongamento da sobrevivência do parasito no hospedeiro (MORRIS et al., 2001; ROGERS; TITUS, 2003). Além disso, a apirase, uma enzima com função de anti-agregação plaquetária encontrada em ambos os gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* também exerce papel importante durante o processo de transmissão de *Leishmania* (VOLF; TESAROVÁ; NOHÝNKOVA, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

A incidência da LV tem aumentado significativamente em várias regiões endêmicas, inclusive no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, onde há uma expansão gradual ao longo dos últimos anos. Diante da persistência e aumento do número de casos, esta zoonose tem causado um grande impacto na saúde pública.

Estudos de interação *Leishmania*-vetor são cruciais para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e transmissão do parasito. No entanto, apenas um número limitado de espécies do Novo Mundo tem sido avaliadas experimentalmente para a susceptibilidade de *Leishmania* spp. Até o momento, a maioria dos estudos tem avaliado o desenvolvimento de *L. (L.) infantum* em *L. longipalpis* (LAINSON; SHAW, 1988; MAIA et al., 2011; ROGERS; BATES, 2007; SEBLOVA et al., 2015), de maneira que as informações sobre a competência vetorial de outras espécies de flebotomíneos permanecem desconhecidas.

Apesar das características epidemiológicas e comportamentais que indicam a participação de *L. migonei* como vetor de *L. (L.) infantum*, não existem estudos que demonstrem o desenvolvimento do parasito nesta espécie. Estes estudos poderão auxiliar estudos futuros para a comprovação da competência vetorial de *L. migonei*, bem como estimar o risco de surgimento de novos focos da LV e subsidiar o desenvolvimento de estratégias mais específicas e eficazes de controle da doença.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Lutzomyia migonei é susceptível ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum*?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* ao desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania) infantum* para elucidar o papel desta espécie de flebotomíno no ciclo de transmissão da LV.

5.2 Objetivos Específicos

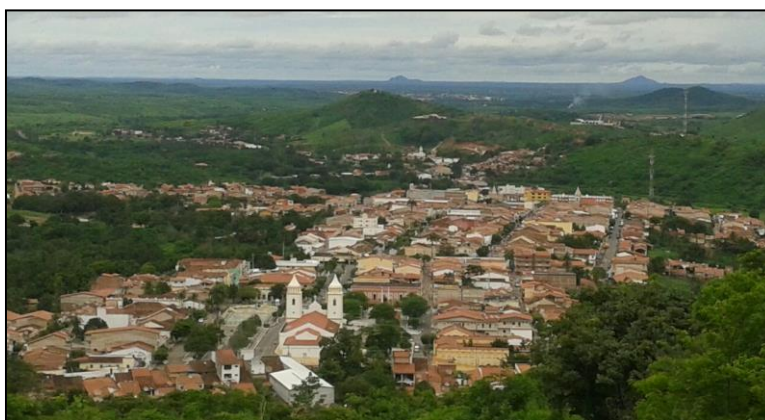
- a) Estabelecer a colônia de espécimes de *L. migonei*;
- b) Avaliar o ciclo de vida de *L. migonei* em condições laboratoriais;
- c) Estudar o desenvolvimento de *L. (L.) infantum* em espécimes colonizados de *L. migonei*;
- d) Comparar a intensidade e a localização de *L. (L.) infantum* em *L. migonei* e *L. longipalpis*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Captura dos flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados para o estabelecimento da colônia de *L. migonei* foram capturados no município de Baturité (04°19'41"S, 38°53'05"W), localizado na mesorregião Norte, distante 93 km de Fortaleza, estado do Ceará, Brasil (Figura 7). O município apresenta incidência de ambas as formas de leishmanioses, sendo classificado como uma área de transmissão esporádica para LV. Os insetos foram capturados com armadilhas luminosas tipo CDC (Center for Disease Control) posicionadas por um período de 12h em abrigos de animais (estábulo, galinheiros e chiqueiros) (Figura 8) localizados no peridomicílio de casas onde estudos entomológicos prévios demonstraram a predominância da espécie (95% da fauna).

Figura 7 – Vista panorâmica do município de Baturité, Ceará.



Fonte: a autora

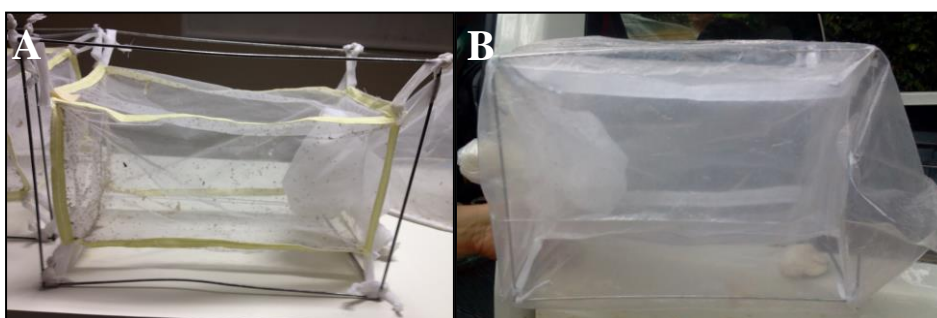
Figura 8 – Locais de captura de *Lutzomyia migonei* no município de Baturité, Ceará.



Fonte: a autora

Os espécimes capturados foram transferidos com o auxílio de capturadores para gaiolas (20 x 20cm) revestidas com tecido voil (Figura 9A), envolvidas por um saco plástico contendo um chumaço de algodão umedecido com água para manutenção da umidade necessária a sobrevivência dos insetos (Figura 9B). As gaiolas foram acondicionadas em caixas de isopor, nas quais também havia chumaços úmidos de algodão e transportadas para o ponto de apoio localizado na área de estudo.

Figura 9 – Materiais utilizados para o acondicionamento dos flebotomíneos.



Fonte: a autora

Nota: A- gaiola para flebotomíneos, B- gaiola envolta por saco plástico.

6.2 Estabelecimento e manutenção da colônia de *L. migonei*

O estabelecimento e a manutenção da colônia de *L. migonei* foram realizados de acordo com Volf e Volfova (2011). As fêmeas capturadas foram alimentadas por um período de uma hora em hamster (*Mesocricetus auratus*) colocado dentro da gaiola (Figura 10A), previamente anestesiado por via intramuscular com quetamina (0,1mL/ 100g). Decorridas 24h após repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas foram transferidas individualmente para frascos de vidro forrados com papel de filtro para realização da oviposição (Figura 10B). Posteriormente, foram condicionadas em caixa de isopor e transportadas para o insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil.

Diariamente, os insetos foram alimentados com solução de sacarose a 50% e o papel de filtro foi umedecido com água destilada para a manutenção da umidade. Após a morte, as fêmeas foram montadas entre lâmina e lamínula em solução Berlese e identificadas de acordo com a classificação proposta por Young & Duncan (1994). Os ovos pertencentes as fêmeas de *L. migonei* foram transferidos com o auxílio de um pincel fino para papel de filtro

previamente umedecido com água destilada e enviados para o laboratório de parasitologia da Faculdade de Ciências da Charles University em Praga, República Theca, onde a colônia foi mantida.

Os ovos foram transferidos para potes de plástico com base e laterais de gesso mantidos dentro de caixas com areia autoclavada umedecida com água destilada, para a emergência e sobrevivência das larvas (Figura 10C). Após eclosão, as larvas foram alimentadas com uma mistura de fezes e ração para coelho na proporção de 1:1. Para a alimentação das larvas no quarto estágio, a esta mistura foi acrescida ração para peixe triturada.

Após a emergência, os espécimes adultos foram transferidos para gaiolas de criação (40 x 40cm) envoltas por um saco plástico transparente contendo algodão embebido em água, onde receberam solução de sacarose a 50% suplementada com antibiótico penicilina na concentração de 5000U/mL e alimentação sanguínea em hamsters (*Mesocricetus auratus*), camundongos (*Mus musculus*) ou coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 10D). Adicionalmente, os insetos foram expostos a fotoperíodo (14h de luz e 10h de escuro), mantidos a uma temperatura de 26°C e 70% de umidade. Os recipientes de criação foram inspecionados diariamente para avaliação do ciclo de vida.

Figura 10 – Animais e equipamentos utilizados para o estabelecimento e manutenção da colônia de *Lutzomyia migonei*.



Fonte: a autora

Nota: A- alimentação sanguínea de flebotomíneos capturados no campo, B- frascos utilizados para individualização das fêmeas, C- potes com larvas mantidos dentro de caixas com areia autoclavada, D- alimentação sanguínea de flebotomíneos em coelho.

6.3 Manutenção da colônia de *L. longipalpis*

Fêmeas de *L. longipalpis* pertencentes a colônia previamente estabelecida no insetário da Faculdade de Ciências da Charles University de espécimes capturados no município de Jacobina, Bahia, Brasil, foram mantidos a temperatura de 27°C e 70% de umidade expostos a fotoperíodo (14h de luz e 10h de escuro) (VOLF; VOLFOVA, 2011). A alimentação das formas imaturas, bem como dos espécimes adultos foram realizadas como descrito para a manutenção da colônia de *L. migonei* e utilizadas como controle nos ensaios de infecção experimental.

6.4 Cultivo de *Leishmania (Leishmania) infantum* e contagem dos parasitos

Foram utilizadas promastigotas de *L. (L.) infantum* cepa viscerotrópica (MHOM/BR/76/M4192) isolada de um paciente no Brasil e *L. (L.) infantum* cepa dermatotrópica (ITOB/TR/2005/CUK3) isolada de *Phlebotomus tobbi* na Turquia (SVOBODOVA et al., 2009). Os parasitos com menos de 12 passagens *in vitro* desde o isolamento foram cultivados a 23°C em 1,5 mL de meio M199 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA), 250 µg/mL de antibiótico amicacina (Bristol-Myers Squibb, República Theca), 1% BME vitaminas (Sigma) e 2% de urina estéril. O crescimento dos parasitos foi observado diariamente por microscopia óptica.

Após o crescimento, os parasitos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 23°C. O meio de cultura foi desprezado e o sedimento lavado e ressuspensão em 990µL de solução salina estéril. Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 10µL que foi diluída em 990 µL de formaldeído em solução salina a 1%. Posteriormente, 10 µL desta diluição foi aplicada em cada lado da câmara de Neubauer e as promastigotas foram contadas para a obtenção de 1×10^6 parasitos/mL.

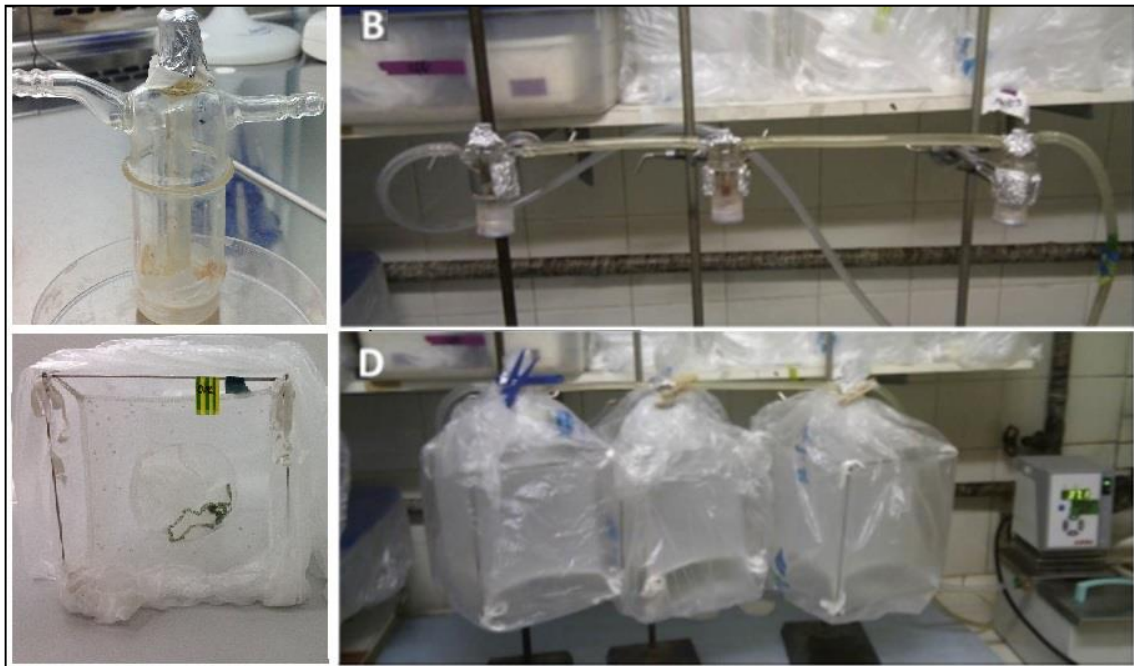
6.5 Infecção experimental dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram infectados artificialmente com sangue de coelho desfibrinado (Bioveta, República Theca) através de alimentador de vidro (Figura 11A) envolto por uma membrana de pele de pinto. Para tanto, a pele foi retirada da região ventral dos animais com o auxílio de tesouras e pinças esterilizadas. Posteriormente, foram lavadas por duas vezes durante cinco minutos em solução de etanol a 70%, seguida por duas lavagens de cinco minutos em solução salina estéril e armazenadas individualmente em placas de Petri a -20°C. Anteriormente a sua utilização, as membranas foram descongeladas posicionadas sobre a abertura do alimentador e envoltas com parafilme.

Para a infecção experimental, foram utilizados 1×10^6 parasitos/mL obtidos através da diluição de 300 μ L da suspensão do parasito em solução salina (1×10^7 promastigotas/ml de *Leishmania (L.) infantum*) em 2700 μ L de sangue de coelho inativado pelo calor (56°C por 35 minutos).

O sangue de coelho contendo as formas promastigotas foi adicionado aos alimentadores em condições estéreis e, em seguida, os alimentadores foram fixados em um suporte e conectados a tubulação com banho de água a 37°C para manter o sangue na temperatura fisiológica (Figura 11B). Os alimentadores foram colocados dentro de gaiolas (Figuras 11C e 11D), nas quais, cerca de 300 fêmeas de *L. migonei* (utilizadas a partir da 6ª geração) e 150 de *L. longipalpis* foram utilizadas por experimento. As fêmeas com 2 a 6 dias de emergência, cuja alimentação com sacarose foi retirada 24h antes da infecção experimental, foram alimentadas por um período de 2h. Adicionalmente, CO₂ foi exalado nas gaiolas para estimular a alimentação sanguínea. Em todos os experimentos foram utilizadas as seguintes combinações: *L. migonei*-(MHOM/BR/76/M4192), *L. migonei*-(ITOB/TR/2005/CUK3) e *L. longipalpis*-(MHOM/BR/76/M4192) com susceptibilidade conhecida para *L. (L.) infantum* (MAIA et al., 2011) foi utilizada como controle.

As fêmeas alimentadas foram contadas, transferidas para outras gaiolas e mantidas sob as mesmas condições da colônia. Posteriormente, foram dissecadas para estudar o desenvolvimento e localização da infecção no intestino dos flebotomíneos e para observação da intensidade da infecção. Os experimentos foram repetidos cinco vezes.

Figura 11 – Método de alimentação artificial dos flebotomíneos.

Fonte: a autora

Nota: A- alimentador de vidro, B- tubulação com água a 37°C, C- gaiola para flebotomíneos, D- gaiolas com alimentadores de vidro para infecção dos flebotomíneos.

6.6 Desenvolvimento e localização de *Leishmania (Leishmania) infantum in situ*

No 1º, 5º e 8º dias (PI), as fêmeas foram transferidas para uma placa de Petri sobre gelo para imobilização dos insetos. Posteriormente, foram colocadas em uma lâmina e dissecadas em uma gota de solução salina estéril removendo a cabeça, pernas e asas com estilete com ângulo de 90°. Em seguida, o intestino foi removido do corpo do flebotomíneo puxando delicadamente os dois últimos segmentos abdominais. O intestino dissecado foi analisado sob microscopia ótica para a localização do parasito no intestino médio abdominal, intestino médio torácico, região da cárdia ou válvula do estomodeu, bem como para avaliar a intensidade da infecção.

Níveis de infecções de *L. (L.) infantum* foram classificados em quatro categorias de acordo com a Myskova, Votypka e Volf (2008) como: não infectadas, baixa (<100 parasitos por intestino), moderada (100 a 1000 parasitos por intestino) e alta infecção (>1000 parasitos por intestino).

6.7 Morfometria dos parasitos

Esfregaços do intestino de *L. migonei* e *L. longipalpis* infectados com *L. (L). infantum* no 5º e 8º dia (PI) foram fixados com metanol 100%, corados com Giemsa durante 20 minutos, examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x e fotografados com uma câmara D70 Olympus. O comprimento e largura do corpo celular e o comprimento do flagelo de 240 promastigotas selecionadas aleatoriamente de seis fêmeas foram medidos para cada combinação de espécie de flebotomíneo e de *L. (L). infantum* usando o software da Imagem – J.

As promastigotas foram classificadas de acordo com Cihakova e Volf (1997) como (I) nectomonas: comprimento do corpo $\geq 14 \mu\text{m}$; (II) leptomonas: comprimento do corpo $< 14 \mu\text{m}$ e comprimento do flagelo < 2 vezes que o comprimento do corpo; (III) metacíclicas: comprimento do corpo $< 14 \mu\text{m}$ e comprimento do flagelo ≥ 2 vezes o comprimento do corpo.

6.8 Análise estatística

Análise descritiva foi utilizada para avaliar o ciclo de vida de *L. migonei* com o software Rv2.10.0. As diferenças na intensidade das infecções (baixa, moderada ou alta infecção), localização do parasito (intestino médio abdominal, intestino médio torácico, região da cárdia e válvula do estomodeu), foram avaliadas por qui-quadrado (χ^2). Medidas dos parasitos foram comparados pela análise de variância utilizando o software SPSS v. 23, adotando-se como significativo ($p < 0,05$).

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os animais utilizados para a alimentação sanguínea dos flebotomíneos foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências da Charles University em Praga na República Theca de acordo com as orientações institucionais e legislação Theca (Lei n° 246/1992 e 359/2012) sobre a proteção de animais contra crueldade, que cumpre com todos as orientações da União Européia e Internacional para experimentação animal. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética de experimentos de laboratório da Charles University em Praga e foram realizados sob o certificado de competência (registro: CZ 03069).

8 RESULTADOS

8.1 Ciclo evolutivo de *L. migonei* em condições laboratoriais

O ciclo de vida de *L. migonei* a partir dos ovos até a eclosão dos flebotomíneos adultos variou de 35 a 45 dias. O período de incubação dos ovos apresentou um intervalo de 5 a 7 dias, a duração da fase larval foi no mínimo de 17 dias e no máximo de 23 dias e o estágio de pupa perdurou de 5 a 7 dias (Tabela 1). Similarmente, como a maioria das outras espécies de flebotomíneos mantidas na Charles University, foi possível estabelecer e manter a colônia de *L. migonei* com sucesso na temperatura de 26°C e umidade relativa de 70% com controle da presença de fungos e ácaros.

Em relação à alimentação sanguínea, inicialmente as fêmeas foram alimentadas no antebraço de seres humanos e, posteriormente, a fonte de repasto sanguíneo foi substituída por animais. *L. migonei* apresentou preferência alimentar por coelhos, seguido por hamsters e uma baixa preferência por camundongos. Não foram observadas dificuldades durante a alimentação experimental através da membrana de pele de pinto, de maneira que as fêmeas de *L. migonei* revelaram taxa de repasto sanguíneo (68,2%) similar a *L. longipalpis* (70,6%).

Tabela 1- Duração do ciclo de vida de *Lutzomyia migonei* em condições laboratoriais.

Estádio	Variação (dias)	Média \pm DPM
Ovo	5- 7	6,47 \pm 0,92
L1	5-7	5,27 \pm 0,27
L2	5-7	5,53 \pm 0,83
L4	7-9	7,2 \pm 0,56
Pupa	5-7	6,33 \pm 0,90
Adulto	8-10	8,27 \pm 0,59
Duração do ciclo de vida	35-45	36,6 \pm 2,79

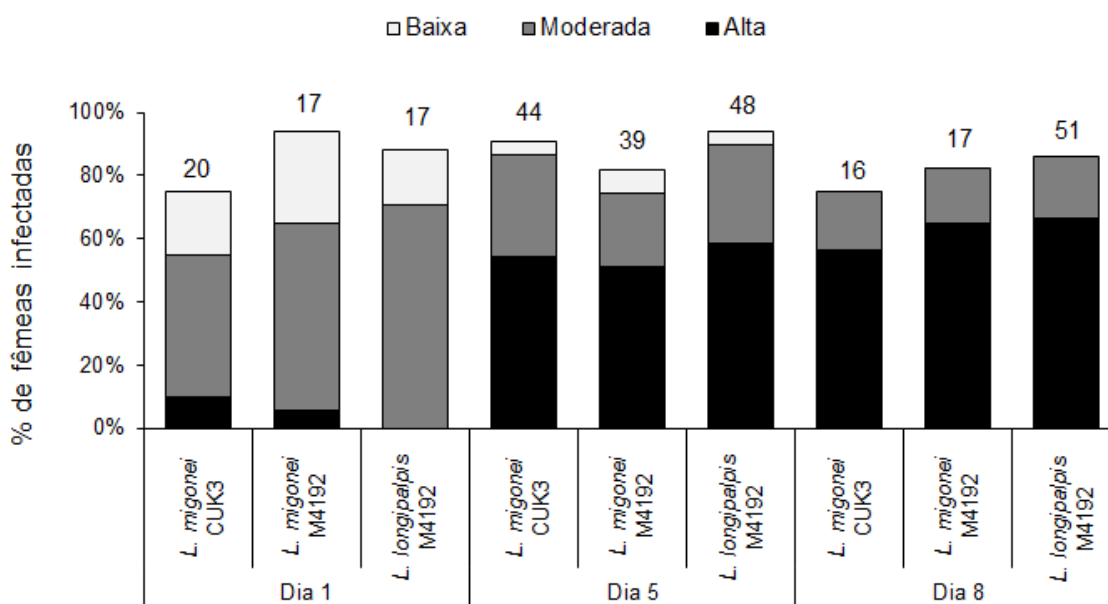
Fonte: a autora

Nota: Desvio Padrão da Média (DPM)

8.2 Desenvolvimento de *L. (L.) infantum* em *L. migonei* e *L. longipalpis*

O desenvolvimento de *L. (L.) infantum* em *L. migonei* foi observado do 1º ao 8º dia PI e comparado com o desenvolvimento em *L. longipalpis*. No 1º dia PI, foram observadas altas taxas de infecção nas fêmeas de todas as combinações vetor-parasito: 75% e 95% em *L. migonei* quando infectado com a cepa CUK3 e M4192, respectivamente e ~90% para as fêmeas de *L. longipalpis*, com todos os parasitos restritos ao interior da MP nas fêmeas de ambas as espécies. Neste estágio da infecção, (45% - 59%) das fêmeas de *L. migonei* e 70% das fêmeas de *L. longipalpis* exibiram uma moderada infecção (100 a 1000 parasitos). Não foram observadas diferenças significativas na taxa de infecção ($\chi^2 = 2,84$, $df = 2$, $P = 0,24$) ou intensidade de infecção ($\chi^2 = 5,73$, $df = 6$, $P = 0,45$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 –Percentual de fêmeas de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* infectadas por *L. (L.) infantum* e densidade de parasitos no intestino.



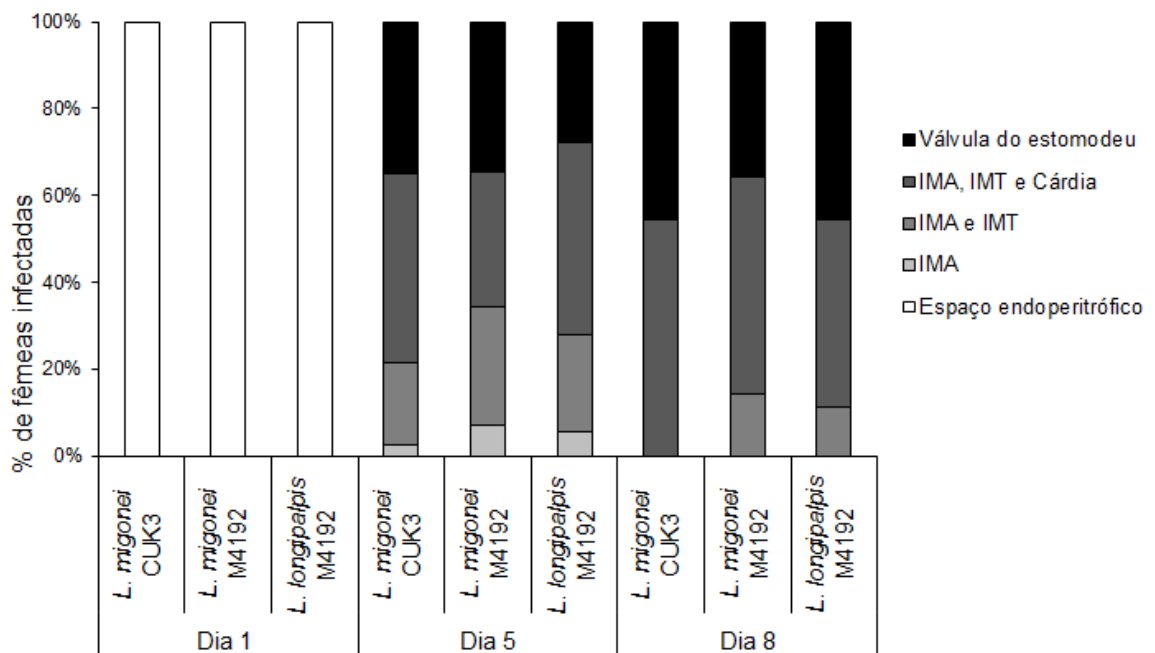
Fonte: a autora.

Nota: os números localizados acima das colunas indicam a quantidade de fêmeas dissecadas.

No 5º dia PI, quando o repasto sanguíneo havia sido digerido e os remanescentes da digestão sanguínea defecados em ambas as espécies, as taxas de infecção mantiveram-se elevadas, 90% em *L. migonei*-CUK3, 82% em *L. migonei*-M4192 e 94% em *L. longipalpis*-

M4192 e a intensidade das infecções foram altas em todas as combinações vetor-parasito avaliadas. Similarmente, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de infecção ($\chi^2 = 3,26$, $df = 2$, $P = 0,19$) ou intensidade de infecção ($\chi^2 = 4,36$, $df = 6$, $P = 0,62$) entre as espécies. Os parasitos migraram anteriormente para colonizar o intestino médio torácico e a região da cárdia em 43% de *L. migonei*-CUK3, 31% de *L. migonei*-M4192 e 44% de *L. longipalpis*-M4192. A colonização da válvula do estomodeu foi observada mais frequentemente em *L. migonei*-CUK3 (35%), seguido por *L. migonei*-M4192 (34%) e *L. longipalpis*-M4192 (27% das fêmeas infectadas). Nenhuma diferença estatística significativa foi observada na localização da infecção entre os grupos ($\chi^2 = 2,3$, $df = 6$, $P = 0,88$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Localização da infecção de *L. (L.) infantum* de acordo com os dias pós-infecção em diferentes regiões do intestino de fêmeas de *L. migonei* e *L. longipalpis*.



Fonte: a autora.

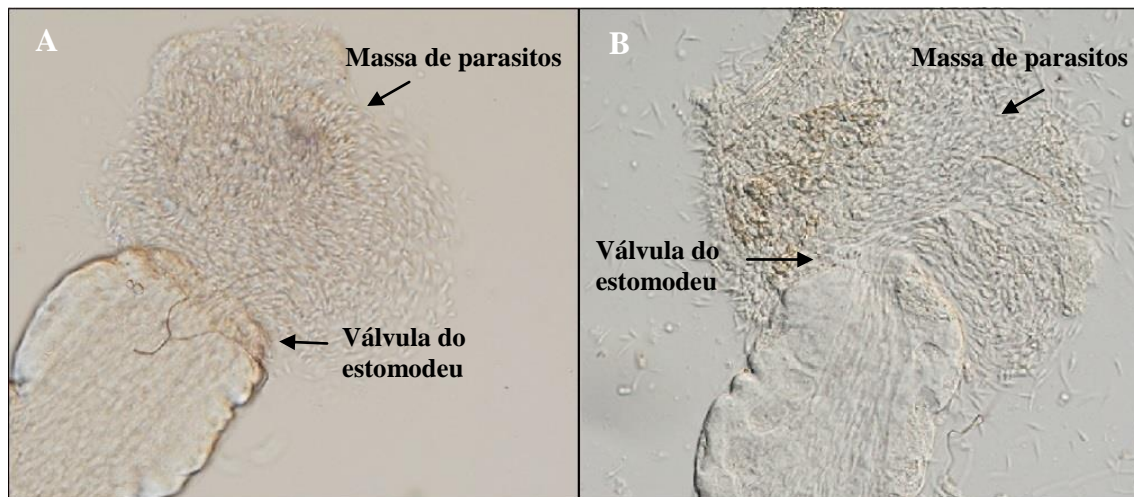
Nota: IMA (intestino médio abdominal), IMT (intestino médio torácico).

No estágio tardio da infecção (8º dia PI), ambas as cepas de *L. (L.) infantum* continuaram o desenvolvimento. Em todas as combinações vetor-parasito, as taxas de infecção foram elevadas, 75% em *L. migonei*-CUK3, 82% em *L. migonei*-M4192 e 86% em *L. longipalpis*-M4192 ($\chi^2 = 1,12$, $df = 2$, $P = 0,56$). Foi observada alta intensidade de infecção na maioria das fêmeas de todos os grupos ($\chi^2 = 1,17$, $df = 4$, $P = 0,82$). A colonização da

válvula do estomodeu foi observada em 45% de *L. migonei*-CUK3 e *L. longipalpis*-M4192 e 35% de *L. migonei*-M4192. Os parasitos desenvolveram similarmente de maneira que nenhuma diferença significativa foi observada na localização da infecção ($\chi^2 = 1,96$, $df = 4$, $P = 0,74$).

Análise por microscopia óptica revelou no intestino das fêmeas de *L. migonei* dissecadas uma massa de promastigotas de *L. (L.) infantum* CUK3 e M4192 na região da cárdia aderida à válvula do estomodeu (Figura 12). Esta massa de parasitos acompanhada do PSG também foi observada no intestino médio abdominal.

Figura 12- Intestino médio torácico com a região da cárdia e a válvula do estomodeu de *Lutzomyia migonei*.



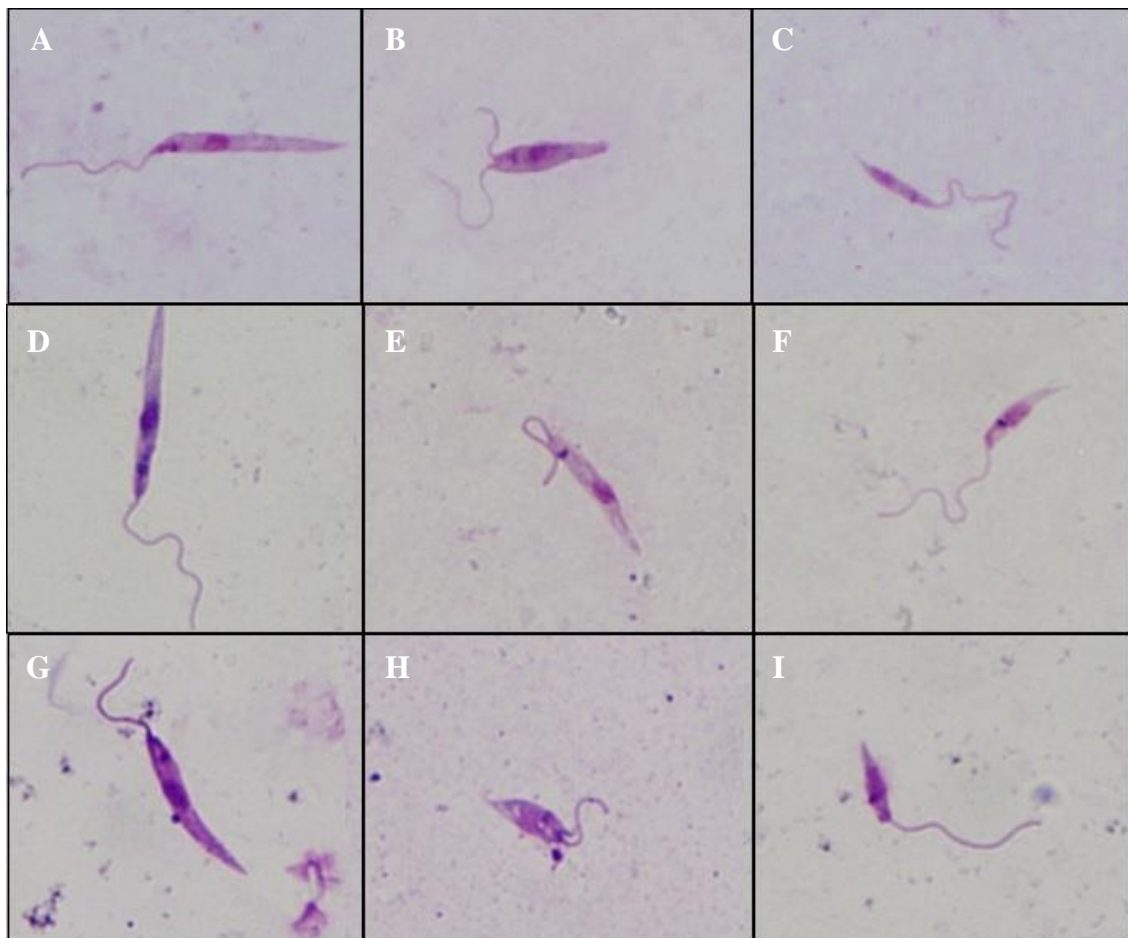
Fonte: a autora

Nota: A) Infecção de *L. infantum* CUK3 no 5° dia PI, B) Infecção de *L. infantum* M4192 no 8° dia PI.

8.3 Análise morfométrica de promastigotas de *L. infantum* em *L. migonei* e *L. longipalpis*

A morfologia de *L. (L.) infantum* foi estudada em *L. migonei* e *L. longipalpis* no 5° e 8° dias PI quando havia ocorrido a desintegração da MP. As formas nectomonas, leptomonas e metacíclicas foram encontradas no intestino de ambas as espécies durante a evolução da infecção (Figura 13A-I).

Figura 13- Formas morfológicas de *L. (L.) infantum* encontradas no intestino de *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* no 8° dia PI.



Fonte: a autora.

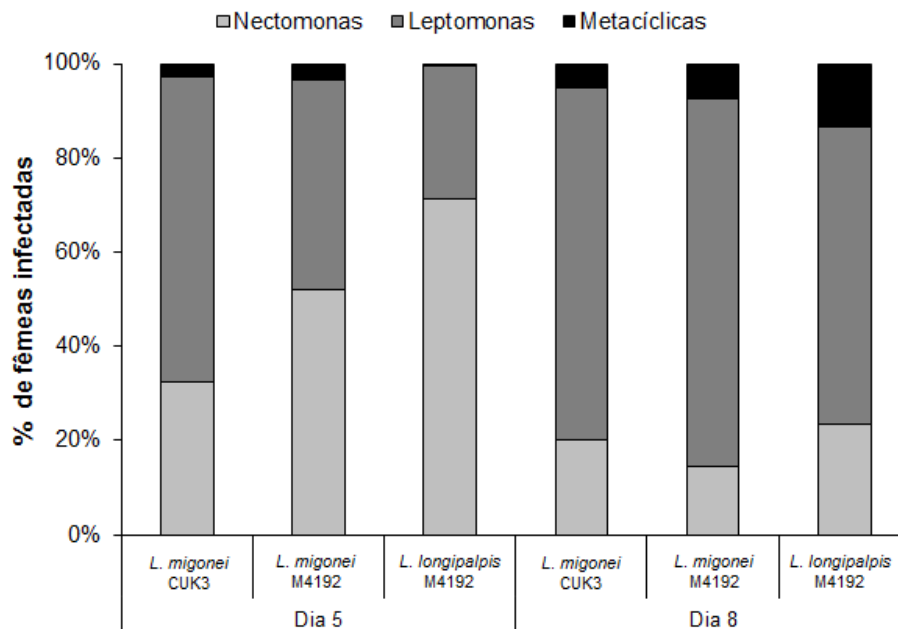
Nota: A, B e C – Promastigota nectomona, leptomona e metacíclica de *L. (L.) infantum*-CUK3 encontradas em *L. migonei*. D, E e F – Promastigota nectomona, leptomona e metacíclica de *L. (L.) infantum*-M4192 encontradas em *L. migonei*. G, H, I – Promastigota nectomona, leptomona e metacíclica de *L. (L.) infantum*-M4192 encontradas em *L. longipalpis*.

No 5° dia PI, período pós-defecação, foram observadas diferenças no desenvolvimento das cepas de *L. (L.) infantum* (Gráfico 4). A maioria dos parasitos foram nectomonas nas infecções por *L. infantum* M4192 em *L. migonei* (52%) e *L. longipalpis* (71%), seguido pelas formas leptomonas 44% e 28%, respectivamente. Em contrapartida, 64% dos parasitos foram leptomonas em *L. migonei* infectados por *L. (L.) infantum* CUK3. As formas metacíclicas foram encontradas em todas as combinações vetor-parasito, mas em baixa proporção, de 1 a 3%. As diferenças nas formas promastigotas entre os grupos foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 74,5$, $df = 4$, $P < 0,001$).

No 8° dia PI, os parasitos evoluíram de forma semelhante e o percentual de formas metacíclicas aumentou em todas as combinações estudadas. Não houve diferenças

significativas na proporção das formas morfológicas de *L. (L.) infantum* M4192 e CUK3 em fêmeas de *L. migonei* ($\chi^2 = 3,37$, $df = 2$, $P = 0,18$). A percentagem das formas nectomonas diminuiu, enquanto que as formas leptomonas aumentaram para 78% e 75%, respectivamente. As formas metacíclicas em *L. migonei* foram encontradas em 5% e 7,5% de CUK3 e M4192, respectivamente. Em *L. longipalpis*, a proporção de formas morfológicas foi estatisticamente diferente, com 63% de leptomonas, 23% de nectomonas e 13% de formas metacíclicas ($\chi^2 = 19,7$, $df = 4$, $P = 0,001$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Formas morfológicas de *L. (L.) infantum* durante o desenvolvimento em *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis*.



A análise morfométrica

Fonte: a autora

observaram diferenças significativas em todas as condições.

Tabela 2 - Dimensões das formas morfológicas de *L. (L.) infantum* descritos no gráfico 4 durante o desenvolvimento em *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* no 5° e 8° dias PI.

Dia PI	Vetor-parasito	Forma morfológica	N	Comprimento do corpo		Largura do corpo		Comprimento do flagelo	
				Média (µm)	Variação (µm)	Média (µm)	Variação (µm)	Média (µm)	Variação (µm)
5	<i>L. migonei</i> -CUK3	PN	78	15.8 (1.4)	14.0-19.1	2.4 (0.4)	1.6-3.7	17.6 (3.5)	7.0-26.1
		PL	155	10.4 (2.0)	5.9-13.8	2.3 (0.5)	1.2-3.7	13.7 (3.4)	5.5-24.2
		PM	7	8.2 (1.2)	6.4-9.9	2.6 (0.5)	1.9-3.6	19.0 (4.5)	13.8-24.8
		Total	240	12.1 (3.1)	5.9-19.1	2.4 (0.5)	1.2-3.7	15.1 (3.9)	5.5-26.1
	<i>L. migonei</i> -M4192	PN	125	16.1 (1.5)	14.0-20.9	2.6 (0.5)	1.7-4.2	18.1 (4.5)	6.1-31.7
		PL	107	11.7 (1.7)	6.8-13.9	2.6 (0.6)	1.4-5.9	15.7 (4.8)	6.8- 27.7
		PM	8	8.5 (0.6)	7.7-9.8	2.7 (1.1)	1.4-5.2	20.3 (3.5)	15.4-25.1
		Total	240	13.9 (2.8)	6.8-20.9	2.6 (0.6)	1.4-5.9	17.1 (4.8)	6.1-31.7
	<i>L. longipalpis</i> -M4192	PN	171	17.5 (3.0)	14.0-26.8	2.4 (0.5)	1.0-3.8	22.0 (6.0)	4.5-36.8
		PL	68	11.2 (1.8)	7.0-13.9	2.4 (0.5)	1.1-3.8	14.8 (4.5)	7.9-24.1
		PM	1	13.7		2.3		28.0	
		Total	240	15.7 (3.9)	7.0-26.8	2.4 (0.5)	1.0-3.8	20.0 (6.5)	4.5-36.8
8	<i>L. migonei</i> -CUK3	PN	48	16.0 (2.0)	14.0-22.1	2.4 (0.5)	1.5-3.8	16.2 (2.7)	9.6-21.7
		PL	180	10.2 (2.0)	5.0-13.9	2.1 (0.6)	1.0-4.4	13.5 (3.2)	5.4-24.1
		PM	12	6.6 (1.4)	3.6-8.8	1.8 (0.5)	1.1-3.0	15.7 (2.9)	8.7-19.2
		Total	240	11.2 (3.2)	3.6-22.1	2.1 (0.6)	1.0-4.4	14.2 (3.3)	5.4-24.1
	<i>L. migonei</i> -M4192	PN	35	15.4 (1.1)	14.0-18.1	2.2 (0.4)	1.4-3.3	16.1 (4.1)	8.0-24.0
		PL	187	9.8 (2.1)	5.4-13.9	2.4 (0.5)	1.1-4.1	13.4 (3.5)	3.7-24.0
		PM	18	6.9 (1.2)	5.0-10.3	2.1 (0.7)	1.2-3.8	16.4 (2.0)	13.5-22.2
		Total	240	10.4 (2.9)	5.0-18.1	2.3 (0.5)	1.1-4.1	14.0 (3.7)	3.7-24.0
	<i>L. longipalpis</i> -M4192	PN	56	15.9 (1.3)	14.0-19.2	2.2 (0.4)	1.6-3.4	18.1 (4.1)	8.2-28.4
		PL	152	10.5 (1.9)	6.4-13.9	2.2 (0.6)	1.1-4.6	14.4 (3.1)	7.3-22.8
		PM	32	7.3 (1.3)	5.1-12.2	2.1 (0.8)	1.1-5.6	16.4 (2.5)	12.7-26.3
		Total	240	11.3 (3.2)	5.1-19.2	2.2 (0.8)	1.1-5.6	15.5 (3.6)	7.3-28.4

Fonte: a autora

Nota: Promastigota Nectomona (PN), Promastigota Leptomona (PL) e Promastigota metacíclica (PM).

9 DISCUSSÃO

A demonstração do desenvolvimento de *Leishmania* em flebotomíneos sob condições experimentais constitui um dos parâmetros essenciais para incriminação vetorial. É insuficiente estudar a competência vetorial usando apenas PCR com base na detecção de DNA de *Leishmania* (SEBLOVA et al., 2013), uma vez que esta abordagem não fornece qualquer informação sobre a viabilidade, localização e estágio de desenvolvimento dos parasitos no vetor. Neste sentido, torna-se imprescindível a colonização de espécies de flebotomíneos em número suficiente para investigar a susceptibilidade ao parasito em condições de laboratório, no entanto, isto tem sido um fator crítico e limitante devido às dificuldades no estabelecimento e manutenção das colônias destes insetos (VOLF; VOLFOVA, 2011).

Uma importante limitação para a criação de flebotomíneos é a necessidade de ter uma alimentação adequada para as larvas, que representa um dos requisitos básicos para a criação e constitui o fator mais importante para manter colônias vigorosas destes insetos (MODI; TESH, 1983). Vários estudos têm investigado as dietas para as fases imaturas de diferentes espécies de flebotomíneos (GOULART et al., 2015; MANN; KAUFMAN, 2010; RIBEIRO et al., 2015; SEBLOVA et al., 2013). A mistura de fezes e ração para coelho tem sido utilizada com sucesso em condições de laboratório (SEBLOVA et al., 2013; VOLF; VOLFOVA, 2011), sendo importante na redução do crescimento de fungos (YOUNG; PERKINS; ENDRIS, 1981). Em nossos experimentos, a alimentação das larvas do quarto estágio foi enriquecida com ração para peixe. Goulart et al. (2015) observaram que durante a colonização de *L. neivai*, as dietas que utilizaram este componente foram mais atrativas para as larvas de flebotomíneos em comparação com aquelas sem este alimento. Estas observações corroboram com estudo prévio durante a colonização de *L. intermedia* e *L. longipalpis* (RANGEL et al., 1986).

A duração do ciclo de vida de *L. migonei* (35 a 45 dias) mantidos na temperatura de 26° C e 70% de umidade relatado neste estudo é semelhante ao observado em outras espécies de flebotomíneos, tais como *L. longipalpis* (VOLF; VOLFOVA, 2011), *L. lenti* (BRAZIL et al., 1997), *L. evansi* (MONTROYA-LERMA; CADENA-PEÑA; JARAMILLO-SALAZAR, 1998) e *P. papatasi* (VOLF; VOLFOVA, 2011). Por outro lado, espécimes de *L. migonei* apresentaram um período de desenvolvimento de 41 a 55 dias quando colonizados na temperatura de 25° C e 80% de umidade (OVALLOS, 2011). A diferença entre o tempo de

desenvolvimento de *L. migonei* no presente estudo e o descrito pode estar relacionada a diferenças na temperatura, umidade, alimentação para as larvas ou a fonte de repasto sanguíneo utilizados para a colonização dos insetos.

Considerando que a fonte de alimentação sanguínea dos flebotomíneos pode variar de acordo com a espécie (VOLF; VOLFOVA, 2011), e que constitui um dos fatores influenciadores na oviposição (CHAGAS et al., 2007; NOGUERA; RONDÓN; NIEVES, 2006), *L. migonei* foi submetido ao repasto sanguíneo em três espécies de animais e exibiu preferência por coelhos. Este resultado se assemelha aos obtidos em estudos com *P. perniciosus* (VOLF; VOLFOVA, 2011) e *P. tobbi* (SEBLOVA et al., 2015). De acordo com Volf e Volfova (2011), este conhecimento é fundamental para o sucesso na criação de populações de flebotomíneos, uma vez que a adaptação dos insetos a uma fonte alternativa de repasto sanguíneo é um processo longo e pode perdurar por muitas gerações.

Vários estudos de interação vetor-parasito têm utilizado o método de infecção experimental por *Leishmania* com alimentação em animais infectados ou em sistemas de alimentação artificial que podem ser usados para infectar flebotomíneos (FREITAS et al., 2012; MAIA et al., 2011; PRUZINOVA et al., 2015; SÁDLOVÁ et al., 2013; SEBLOVA et al., 2015; WARD; LAINSON; SHAW, 1978). Em animais infectados, tais como camundongos BALB/c e hamsters (*Mesocricetus auratus*) a taxa de infecção é imprevisível, uma vez que existem muitas variáveis que influenciam a infecção. A variação local da densidade de parasitos na pele e as infecções por *L. (L.) infantum*, geralmente, resultam em taxas de infecção muito baixas em torno de 5% (MICHALSKY et al., 2007; VOLF; VOLFOVA, 2012). Desta forma, no presente estudo foi utilizada a alimentação artificial em membrana que permite controlar e quantificar alguns fatores, tais como a forma evolutiva e a concentração do parasito utilizada durante a alimentação. Embora algumas espécies de flebotomíneos apresentem relutância para se alimentarem através deste método (MANN; KAUFMAN, 2009; SEBLOVA et al., 2015), não foram observadas dificuldades durante a alimentação experimental de *L. migonei* ao utilizar a membrana de pele de pinto.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, a elevada suscetibilidade de *L. migonei* para cepa viscerotrópica (M4192) e dermatotrópica (CUK3) de *L. (L.) infantum*. Uma alta porcentagem de fêmeas infectadas de *L. migonei* e *L. longipalpis* foi observada em todos os dias analisados nas infecções por ambas as cepas do parasito com média de 80%. Outros estudos têm demonstrado porcentagens similares de *L. migonei* infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (NIEVES; PIMENTA, 2000), bem como nos estudos realizados de infecção de *L. longipalpis* com *L. (L.) infantum* (FREITAS et al., 2012;

SÁDLOVÁ et al., 2013; SEBLOVA et al., 2015).

Em síntese, os parasitos sobreviveram à digestão do repasto sanguíneo, evitaram a expulsão durante o processo de defecação, estabeleceram infecções em estágio final no intestino médio e colonizaram o intestino torácico e a válvula do estomodeu, que é o pré-requisito para o êxito da transmissão pela picada (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006; ROGERS; BATES, 2007). Além disso, o desenvolvimento de ambas as cepas de *L. infantum* em *L. migonei* foi semelhante e não foram encontradas diferenças significativas em comparação ao desenvolvimento de *L. longipalpis*.

O desenvolvimento dos parasitos foi similar a outros estudos com a presença de promastigotas metacíclicas e a colonização da válvula do estomodeu já no dia 5º dia PI. Estudos prévios que utilizaram *L. migonei* infectados por *L. amazonensis* (NIEVES; PIMENTA, 2000) e *L. longipalpis* infectados por *L. infantum* (FREITAS et al., 2012) também demonstraram o estabelecimento da infecção no intestino médio torácico a partir do 5º dia PI. Por outro lado, o surgimento de promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* em *L. longipalpis* após este período também tem sido demonstrado (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MONTOYA-LERMA et al., 2003). O tempo para o aparecimento das formas metacíclicas nesta região pode variar de acordo com a combinação vetor-parasito (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002) e pode representar adaptações das espécies para possibilitar a transmissão em condições naturais (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

Com relação à morfologia dos parasitos, a distribuição das formas promastigotas de *Leishmania* no 5º dia PI, revelou um percentual de 64% das formas leptomonas em (CUK3), demonstrando que em *L. migonei* a cepa dermatrópica apresentou um desenvolvimento morfológico mais rápido do que a viscerotrópica (M4192), que apresentou um percentual de 44% destas formas. Neste estágio da infecção, quando a desintegração da MP havia ocorrido em ambas as espécies, as formas nectomonas colonizaram o epitélio do intestino médio, evitando a sua defecação junto com as fezes e migraram como leptomonas para colonizar o intestino médio torácico.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o processo de desintegração da MP (PIMENTA et al., 1997; PRUZINOVA et al., 2015; SÁDLOVÁ; VOLF, 2009; SCHLEIN; JACOBSON; SCHLOMAI, 1991). Os estudos mais recentes sugerem que seja um processo espécie-específico (PRUZINOVA et al., 2015; SÁDLOVÁ; VOLF, 2009). Entretanto, alguns autores sugerem as quitinases do parasito (SCHLEIN; JACOBSON; SCHLOMAI, 1991), do próprio flebotomíneo (SÁDLOVÁ; VOLF, 2009), ou que a ação de ambas as quitinases produzidas por *Leishmania* e o vetor sejam responsáveis

pela desintegração (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2005). Para a interação *L. migonei*-*L. (L.) infantum*, outros estudos são necessários para esclarecer qual o real mecanismo utilizado.

No estágio tardio da infecção (8º dia PI), a maioria as fêmeas de ambas as espécies tiveram a região da cárdia e a válvula do estomodeu colonizadas por um elevado número de parasitos. Formas metacíclicas foram observadas em todas as combinações vetor-parasito com a porcentagem de (5 - 7,5%) em *L. migonei* comparável aos relatos de *L. (L.) infantum* em *L. longipalpis* (ELNAIEM; WARD, YOUNG, 1994; FREITAS et al., 2012). Até o momento, não há relatos sobre a frequência de promastigotas metacíclicas em flebotomíneos naturalmente infectados, de maneira que, baixas porcentagens de formas infectantes têm sido relatadas em estudos experimentais com espécies de flebotomíneos do Novo Mundo (ELNAIEM; WARD, YOUNG, 1994; FREITAS et al., 2012; NIEVES; PIMENTA, 2000). Em contrapartida, uma proporção de 60% de formas metacíclicas de *L. (L.) major* foi relatada em *P. papatasi* (SARAIWA et al., 1995), sugerindo que as espécies do Velho Mundo podem ser adaptadas para gerar maior número de formas infectantes.

A grande quantidade de parasitos embebidos em gel tipo PSG na região da cárdia e no intestino médio abdominal observado nas fêmeas de *L. migonei* e *L. Longipalpis* corrobora com os resultados de diversos estudos (FREITAS et al., 2012; ROGERS et al., 2004; ROGERS; BATES, 2007). O acúmulo de altas concentrações do PSG estimula a metacicloênese *in vitro* pelo aumento das condições ácidas nessa região devido o fPPG (principal componente do PSG), ser carregado negativamente e promover a diminuição do pH (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; ZAKAI; CHANCE; BATES, 2008). Além disso, a natureza gelatinosa do PSG juntamente com a grande quantidade de parasitos propicia a diminuição local de oxigênio, conhecida por estimular a metacicloênese *in vitro* (MENDEZ et al., 1999).

O processo de metacicloênese no inseto vetor é acompanhado por alterações morfológicas nos parasitos, bem como em algumas alterações bioquímicas no LPG e na expressão de proteínas de superfície (CUNNINGHAM et al., 2001; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). A análise morfométrica dos parasitos no 5º e 8º dias PI revelou diferenças significativas em todos os parâmetro avaliados, com a diminuição do tamanho do corpo celular e aumento do comprimento do flagelo em todas as combinações vetor-parasito, o que caracteriza o processo de metacicloênese.

De acordo com a susceptibilidade a *Leishmania* spp., os flebotomíneos foram classificados como vetores específicos ou permissivos (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; VOLF; MYSKOVA, 2007). As diferenças entre a especificidade dos grupos estão relacionadas com a

capacidade de apoiar o desenvolvimento de uma ou várias espécies de *Leishmania*, respectivamente. Durante a fase inicial da infecção, os parasitos devem se anexar ao epitélio do intestino médio do flebotomíneo para evitar a expulsão durante o processo de defecação (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006). Em vetores específicos a adesão é controlada por lectinas do intestino médio dos flebotomíneos que se ligam a carboidratos terminais do LPG do parasito (KAMHAWI, 2006). Em contraste, o mecanismo de fixação em vetores permissivos de *Leishmania* é provavelmente independente de LPG (MYSKOVA et al., 2007). No entanto, a caracterização detalhada de moléculas que participam permanece a ser determinada. Neste sentido, o relato de que *L. migonei* é susceptível ao desenvolvimento de outras espécies de *Leishmania*, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (NIEVES; PIMENTA, 2000), permite agrupar esta espécie de flebotomíneo ao grupo de vetores permissivos.

De acordo com Maroli et al. (2013), a incriminação vetorial de espécies de flebotomíneos deve ter um contexto epidemiológico, de modo que exista uma relação entre a distribuição geográfica do vetor e o registro de casos humanos da doença, bem como a prova de antropofilia da espécie e da capacidade do vetor em suportar a infecção com as mesmas espécies de parasitos que ocorrem em seres humanos. Neste contexto, a demonstração da elevada susceptibilidade de *L. migonei* à infecção por *L. (L.) infantum* M4192 é o fator crucial para a epidemiologia da LV nas Américas, uma vez que esta cepa foi isolada de um paciente do nordeste do Brasil com LV. Este achado associado aos relatos anteriores de infecção natural desta espécie no Brasil (CARVALHO et al., 2010) e Argentina (MOYA et al., 2015), ao seu hábito alimentar oportunista e comportamento antropofílico (AGUIAR et al., 1987; RANGEL; LAINSON, 2009) caracterizam *L. migonei* como um importante vetor permissivo deste parasito.

10 CONCLUSÕES

- a) Fêmeas de *L. migonei* apresentaram preferência alimentar por coelhos, o que demonstra que esta fonte de repasto sanguíneo é fundamental para o sucesso na colonização desses insetos;
- b) Fêmeas colonizadas de *L. migonei* foram capazes de se infectar artificialmente através de membrana de pele de pinto, revelando alta taxa de repasto sanguíneo;
- c) O presente estudo fornece, pela primeira vez, evidência experimental de que *L. migonei* é susceptível ao desenvolvimento de *L. (L.) infantum*. Ambas as cepas dermatotópica (CUK3) e viscerotópica (M4192) desenvolveram infecção em estágio final com a colonização da válvula do estomodeu na maioria das fêmeas analisadas;
- d) Estes achados permitem uma melhor compreensão do papel de *L. migonei* na epidemiologia da LV.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S. Factors determining the behavior of *Leishmania* sp. in sandflies. Harefuah: Journal of the Israel Medical Association, Tel Aviv, v. 14, p. 1-6, 1938.
- AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 583-584, 1987.
- AGUIAR, V. et al. Distribuição dos casos de leishmaniose visceral humana em Pernambuco, Brasil em 2002. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 36, s. 2, p. 39-40, 2003.
- ALENCAR, J. E. Prevention of calazar in Ceará, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 3, p. 175-180, 1961.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J. et al. The Relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.
- ALVAR, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 02 abr. 2014.
- ARAÚJO, A. P. O. et al. Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107, p. 543-545, 2012.
- ARAÚJO, V. E. M. et al. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001511>>. Acesso em: 14 maio 2014.
- ARAÚJO, V. E. M. et al. Risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban area. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 7, n. 11, 2013. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820760/>>. Acesso em: 03 mar. 2015.
- ARRUDA, W. et al. Leishmaniose Visceral Americana. Brasil-Médico, Rio de Janeiro, v. 63, p. 64-65, 1949.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology, New York, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in new world species of *Leishmania* polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1820, n. 9, p. 1354-1365, 2012.

AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Plebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 405-410, 1991.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Current Molecular Medicine, Omaha, v. 4, p. 601-609, 2004.

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

BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Current Opinion in Microbiology, New York; v. 11, p. 1-5, 2008.

BATES, P. A. et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. Parasites & Vectors, London, v. 8, n. 131, 2015.

BOROVSKY, D.; SCHLEIN, Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 1, n. 3, p. 235-242, 1987.

BOULANGER, N.; BULET, P.; LOUWENBERGER, C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 6, p. 262-268, 2006.

BRAZIL, R. P. et al. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera:Psychodidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v.26, n. 1, p. 191-193, 1997.

BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, M. O. Parthenogenesis in the sand fly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 13, p. 463-464, 1999.

CARVALHO, G. M. L. et al. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vector-Borne Zoonotic Diseases, New York, v. 8, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, M. R. et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest Region of Pernambuco State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, 2007.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010.

CARVALHO, G. M. L. et al. Ecological aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambuí, Brazil. PLoS One, San Francisco, v. 1, p. 1-9, 2013.

CASANOVA, C. et al. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 7, p. 1-9, 2013.

CAVALCANTE, I. J. M.; VALE, M. R. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 911-924, 2014.

CHAGAS, A. C. et al. Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil. Acta Amazônica, Manaus, v. 37, n. 1, p. 127-132, 2007.

CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R.S. The biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: CHANG, K. P.; BRAY, E.S. Leishmaniasis, Amesterdam: Elsevier, 1985, p. 1-30.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, p. 873-882, 2007.

CIHAKOVA, J.; VOLF P. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 91, p. 267-279, 1997.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. Journal of Global Infectious Diseases, Tampa, v. 2, n. 2, p. 124-126, 2010.

COELHO, W. M. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária, São Paulo, v. 19, p. 256–258, 2010.

COURTENAY, O. et al. Low infectiousness of a wild life host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology, London, v. 125, p. 407–414, 2002.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 1, 2014.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and Endotrypanum. Parasitology Today, Cambridge, v. 16, p. 142-144, 2000.

CUNNINGHAM, M. L. et al. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. Science, London, v. 292, p. 285-287, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, p. 411-412, 2005.

DANTAS-TORRES F.; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n.4, p.352-356, 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, maio/jun. 2006b.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. Parasites & Vectors, London, v. 7, n. 22, 2014.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 4, p. 108-212, 1962.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. World Health Statistics Quarterly, Geneve, v.45, p. 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniniais: current situation and new perspectives. Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DILLON, R. J.; LANE, R. P. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 7, p. 225-232, 1993.

DOBSON, D. E. et al. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific scg-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. PLoS Pathogens, San Francisco, v. 6, n. 11, 2010.

DOSTÁLOVÁ, A. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. BMC Genomics, London, v. 12, p. 1-21, 2011.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites & Vectors, London, v. 1, p. 276-287, 2012.

ELNAIEM, D. A.; WARD, R. D.; YOUNG, P. E. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood-meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Parasitology Research, Berlim, v. 80, p. 414-419, 1994.

FORATTINI, O. P. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose. In: Blucher, E. Entomologia Medica. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1973.

FREITAS, V. C. et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 86, p. 606-612, 2012.

GALATI, E. A. B. Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, psychodidae). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. International Journal for Parasitology, New York, v. 33, p. 1027-1034, 2003.

GOULART, T. M. et al. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). Parasites & Vectors, London, v. 8, 2015. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-1035-7>>. Acesso em: 10 Jan. 2016.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in Pernambuco, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 45, n. 1, p. 66-70, 2012.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 357-360, 2014.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 6, p. 230-250, 1993.

HUMBERG R. M. et al. *Leishmania chagasi* in opossumus (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 87, p. 470- 472, 2012.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. Microbes and Infection, Paris, v. 2, p. 1765-1773, 2000.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends in Parasitology, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. Acta Tropica, Basel, v. 35, p. 297-313, 1978.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, Paris, v. 59, p. 555-572, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmania and their phlebotomine vectors. Bulletins de la Societé de Pathologie Exotique et de ses Filiales, Paris, v. 78, p. 747-755, 1985.

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

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sandflies. Clinics in Dermatology, Philadelphia v. 17, p. 279-289, 1999.

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Nature, London, v. 266, p. 628-630, 1977.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. Philosophical Transactions of Royal Society of London, London, v. 321, p. 380-404, 1988.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p. 311-336.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). The leishmaniasis in Biology and Medicine, London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, Paris, v. 63, n. 2, p. 134-145, 1988.

LAWYER, P. G. et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 43, p. 31- 43, 1990.

LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V. Leishmaniasis and trypanosomiasis. In: ELDRIDGE, B. F.; EDMAN, J. D. Medical Entomology, Revised Edition. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 231-298.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. Annual Review of Entomology, Palo Alto, n. 42, p. 525-550, 1997.

LEISHMANIOSE. Relatório de situação, Brasília, DF, n. 5, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 14 mar. 2016.

LIMA, B. S. et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 107, n. 1, p. 592-597, 2013.

MAIA, C. et al. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 5, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001181>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

MAHONEY, A. B. et al. Intra-Species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry, Washington, v. 38, p. 9813-9823, 1999.

MANN, R. S.; KAUFMAN, P. E. Colonization of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) utilizing an artificial blood feeding technique. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 286-294, 2010.

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

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology Today, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCCONVILLE, M. J. et al. Structure of the lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. Journal Biological Chemistry, Baltimore, v. 265, p. 19611-19623, 1990.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. International Journal for Parasitology, New York, v. 37, p. 1047-1051, 2007.

MENDEZ, S. et al. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. Parasitology Research, Berlim, v. 85, n. 6, p. 507-509, 1999.

MODI, G. B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. Journal Medical Entomology, Honolulu, v. 20, n. 5, p. 568-569, 1983.

MOYA, S. L. et al. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. Acta Tropica, Basel, v. 152, p. 181-184, 2015.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA-PEÑA, H.; JARAMILLO-SALAZAR, C. Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 263-268, 1998.

MONTOYA-LERMA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. Acta Tropica, Basel, v. 85, p. 19-29, 2003.

MORRIS, R. V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. The Journal of Immunology, Baltimore, v. 167, p. 5226-5230, 2001.

MUYLDER, G. et al. A Screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 5, n. 7, 2011.

MICHALSKY, E.M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotominae sand flies. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 147, p. 67-76, 2007.

MYSKOVA, J. et al. A lipophosphoglycan independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes and Infection, Paris, v. 9, n. 3, p. 317-24, 2007.

MYSKOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. *Leishmania* in sand flies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. Journal Medical Entomology, Honolulu, v. 45, p. 133-138, 2008.

NICOLLE, C. J. Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisia. Archives de L'Institut Pasteur de Tunis, Tunis, n. 3, p. 1-26, 1908.

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. P. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae), Entomological Society of America, College Park, v. 37, n. 1, p. 134-140, 2000.

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. P. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 640-647, 2002.

NOGUERA, P.; RÓNDON, M.; NIEVES, E. Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. Biomédica [online], Bogotá, v. 26, p. 57-66, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

OVALLOS, F.G. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) Chagasi Cunha & Chagas*. 2011. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PAVLI, A.; MALTEZOU H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 14, p. 1032–1039, 2010.

PÁSCOA, V. et al. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 32, p. 517–523, 2002.

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

- PIMENTA, P. F. P. et al. 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, Washington, v. 91, p. 9155-919, 1994.
- PIMENTA, P. F. P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. Parasitology, London, v. 115, p. 359-369, 1997.
- PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattini* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Tropica, Basel, v.107, p. 66-69, 2008.
- PITALUGA, A. N. et al. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. Molecular Genetics and Genomics, Berlin, v. 282, p. 307-317, 2009.
- PRUZINOVA, K. et al. Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. PLoS One, San Francisco, v. 10, n. 6, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128203>>, Acesso em: 12 set. 2015.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoirs, hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology, London, v. 16, p. 1-20, 2009.
- RANGEL, E. F. et al. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera:Psychodidae) em condições experimentais. 1. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986.
- RANGEL, E. F.; 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, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.
- RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.
- RAMALHO-ORTIGÃO, M. R. et al. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. Insect molecular biology, Oxford, v. 14. n. 6, p. 703-712, 2005.
- RAMALHO-ORTIGÃO, M. R. et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. BCM Genomics, London, v. 8, p. 300, 2007.
- RAMALHO-ORTIGÃO, M. R.; SARAIVA, E. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. The Open Parasitology Journal, Hilversum, v. 4, p. 195-204, 2010.

- READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill, Saint-Maurice, v. 15, n. 10, 2010. Disponível em: < <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505> > Acesso em: 26 ago. 2015.
- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 58, p. 227-250, 2013.
- READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Epidemiology, Oxford n. 6, p. 147–154, 2014.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, p. 581–596, 2007.
- RIBEIRO, L. M. et al. Biological aspects of immature stage of *Nyssomyia whitmani* (Antunes and Coutinho) (Diptera, Psychodidae, Phlebotomine) in laboratory conditions. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 50, p. 100-103, 2015.
- RIOUX, J. A. et al. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France—12. Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Expérience préliminaires. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, Paris, v. 54, p. 673–682, 1979.
- RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for new classification. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, Paris, v. 65, p. 111–125, 1990.
- ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology, London, v. 124, p. 495-507, 2002.
- ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies and enhanced by regurgitation of fPPG. Nature, London, v. 430, p. 463-467, 2004.
- ROGERS, M. E., BATES, P.A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathogens, San Francisco, v. 3, n. 6, p. 818-825, 2007.
- ROGERS, M. E. et al. *Leishmania* chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cellular Microbiology, Oxford, v. 10, p. 1363-1372, 2008.
- ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. Frontiers in Microbiology, New York, v. 3, 2012.
- ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate on human primary *in vitro* immune responses. Parasite Immunology, Oxford, v. 25, p. 127-34, 2003.
- ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America- a systematic review. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, p. 584, 2010.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, New York, v. 3, p. 251-262, 2014.

- RUAS, A. C. N. et al. Voice disorders in mucosal leishmaniasis. PloS One, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101831>>. Acesso em: 09 jun. 2015.
- SACKS, D.L. et al. Identification of a infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science, Washington, v. 2233, p. 1417-1419, 1984.
- SACKS, D. L. et al. The role of lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. Parasitology, London, v. 108, p. 55-62, 1994.
- SACKS, D. L. et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut in regulated by conformation changes in the abundant surface lipophosphoglycan. Journal of Experimental Medicine, New York, v. 181, p. 685-697, 1995.
- SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 97, p. 406-411, 2000.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SÁDLOVÁ, J.; VOLF, P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell and Tissue Research, Berlin, v. 337, n. 2, p. 313-325, 2009.
- SÁDLOVÁ, J. et al. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. Parasites & Vectors, London, v. 6, p. 186-196, 2013.
- SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta Tropica, Basel, v. 113, n. 1, p. 84-87, 2010.
- SANT'ANNA, M. R. et al. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. Parasites & Vectors, London, v. 2, p. 62, 2009.
- SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology, St Albans, v. 12, n. 3, p. 315- 317, 1998.
- SANTOS, V. C. et al. Host modulation by a parasite: How *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favorits development. PLoSOne, San Francisco, v. 9, 2014. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365351>>. Acesso em 24 ago. 2015.
- SARAIVA, E. M. et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression. Associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. Parasitology, London, v. 111, p. 275-287, 1995.

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

SAVANI, E. S. et al. The finding of *Lutzomyia almeroi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniases focus in Serra da Bodoquena, Brazil. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 160, p. 18-24, 2009.

SEBLOVA, V. et al. *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 7, n. 4, 2013.

SEBLOVA, V. et al. Natural hybrid of *Leishmania infantum/L.donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with nonhybrid strains differing in tissue tropism. Parasites & Vectors, London, v. 8, n. 605, 2015.

SECUNDINO, N. F. C. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. Journal Medical Entomology, Honolulu, v. 42, p. 928-938, 2005.

SCHLEIN, Y.; ROMANO, H. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). Experimental Parasitology, New York, v. 62, p. 376-80, 1986.

SCHLEIN, Y.; SCHNUR, L.F.; JACOBSON, R. L. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 84, p. 353-355, 1990.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; SCHLOMAI, J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proceedings of the Royal Society of London- Series B - Biological Sciences, London, v. 245, p. 121-126, 1991.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 89, p. 9944-9948, 1992.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. Parasitology, London, v. 117, p. 467-473, 1998.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distributions, physiology and their control. Journal of Vector Borne Diseases, Delhi, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHAW, J. J. The leishmaniases - survival and expansion in a changing world. A mini review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 91, p. 671–683, 1996.

SHORTT, H. E. et al. Transmission of Indian kala-azar by the bite of *Phlebotomus argentipes*. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 18, p. 1373–1375, 1931.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). leishmaniose visceral - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/lv/bases/lvbrnet.def>>. Acesso em: 09 mar. 2016.

SOARES, R. P. P. et al. *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Molecular Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 121, p. 213-224, 2002.

SOARES, R. P. P. et al. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. International Journal for Parasitology, New York, v. 35, p. 245-253, 2005.

SOUZA, M. B. et al. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, p. 109-118, 2003.

SOUZA, T. L. et al. Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on Marambaia island, Rio de Janeiro State, Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 136, p. 104-107, 2014.

SVAROSVKA, A. et al. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg-2) but not lipophosphoglycan (lpg-1) for survival in permissive sand fly vectors. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, n. 580, 2010.

SVOBODOVA, M.; BATES, P.; VOLF, P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes, Acta Tropica, Basel, v. 68, p. 23-35, 1997.

SVOBODOVA, M. et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. International Journal Parasitology, New York, v. 39, p. 251-256, 2009.

TELLERIA, E. L. et al. Trypsin like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. PLoS One, San Francisco, v. 5, n. 5, 2010.

TELLERIA, E. L. et al. Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 12, 2013.

TRAVI, B. L. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and Parasitological Observation in experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. Experimental Parasitology, New York, v. 88, p. 73-75, 1998.

- TURCO, S. J., DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annual Review Microbiology, Palo Alto, v. 46, p. 65-94, 1992.
- VOLF, P.; TESAROVÁ, P.; NOHÝNKOVA, E. N. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 14, n. 3, p. 251-256, 2000.
- VOLF, P. et al. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. International Journal for Parasitology, New York, v. 34, p. 1221–1227, 2004.
- VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends Parasitology, Oxford, v. 23, p. 91-92, 2007.
- VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 36, Suppl. , p. S1–S9, 2011.
- VOLF, P. et al. Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. Parasitology International, Amsterdam, v. 63, p. 683-686, 2014.
- WALTERS, L. L. et al. Formation and compositions of the peritrophic membrane in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 30, p. 179-198, 1993.
- WARD, R. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v.72, p. 269-276, 1978.
- WILSON, R. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. Plos Neglected Tropical Disease, San Francisco, v. 4, n. 9, 2010. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838647>>. Acesso em: 16 out. 2015.
- YOUNG, D. G.; PERKINS, P. V.; ENDRIS, R. G. A Larval diet for rearing Phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae). Journal Medical Entomology, Honolulu, v. 18, 1981.
- YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute, v. 54, p. 1-881, 1994.
- ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. Parasitology, London, v. 116, p. 305-309. 1998.
- ZULUETA, A. M. et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 61, p. 945–950, 1999.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Guimarães et al. *Parasites & Vectors* (2016) 9:159
DOI 10.1186/s13071-016-1444-2

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Lutzomyia migonei is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães^{1†}, Katerina Pruzinova^{2*†}, Jovana Sadlova², Vera Volfova², Jitka Myskova², Sinval Pinto Brandão Filho¹ and Petr Volf²

Abstract

Background: *Leishmania infantum* is the most widespread etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the world, with significant mortality rates in human cases. In Latin America, this parasite is primarily transmitted by *Lutzomyia longipalpis*, but the role of *Lutzomyia migonei* as a potential vector for this protozoan has been discussed. Laboratory and field investigations have contributed to this hypothesis; however, proof of the vector competence of *L. migonei* has not yet been provided. In this study, we evaluate for the first time the susceptibility of *L. migonei* to *L. infantum*.

Methods: Females of laboratory-reared *L. migonei* were fed through a chick-skin membrane on rabbit blood containing *L. infantum* promastigotes, dissected at 1, 5 and 8 days post-infection (PI) and checked microscopically for the presence, intensity and localisation of *Leishmania* infections. In addition, morphometric analysis of *L. infantum* promastigotes was performed.

Results: High infection rates of both *L. infantum* strains tested were observed in *L. migonei*, with colonisation of the stomodeal valve already on day 5 PI. At the late-stage infection, most *L. migonei* females had their cardia and stomodeal valve colonised by high numbers of parasites, and no significant differences were found compared to the development in *L. longipalpis*. Metacyclic forms were found in all parasite-vector combinations since day 5 PI.

Conclusions: We propose that *Lutzomyia migonei* belongs to sand fly species permissive to various *Leishmania* spp. Here we demonstrate that *L. migonei* is highly susceptible to the development of *L. infantum*. This, together with its known anthropophily, abundance in VL foci and natural infection by *L. infantum*, constitute important evidence that *L. migonei* is another vector of this parasite in Latin America.

Keywords: *Lutzomyia migonei*, *Leishmania infantum*, Vector competence

Background

Visceral leishmaniasis (VL) caused by protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) is a vector-borne neglected disease transmitted by phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) [1]. *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) is the most widespread etiological agent of VL in the world, including Latin America, with significant mortality rates in human cases [2]. Approximately 56 phlebotomine sand fly species are supposed, or have been proved, to be involved in the transmission of *Leishmania* spp. in

the Americas [1]. Unfortunately, control strategies against vectors as well as reservoirs of leishmaniasis have been ineffective [3].

In Latin America, *L. infantum* is primarily transmitted by *Lutzomyia longipalpis* [4]. This sand fly species fulfils all criteria of a proven vector, which includes the ability of the insect to support the development of the parasite during and after bloodmeal digestion, as well as to transmit them to a susceptible host [5]. On the other hand, information about the vector competence of other *Lutzomyia* spp. to *L. infantum* is lacking, despite field data suggesting their possible involvement in the circulation of this parasite.

The vectorial role of *Lutzomyia migonei* has been discussed in areas with a record of human and canine cases

* Correspondence: katerina.pruzinova@gmail.com

†Equal contributors

²Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



of VL but where the proven vector is absent [6–9]. In a study conducted in southeast Brazil, the absence of *L. longipalpis* in six endemic areas provided circumstantial evidence for the participation of *L. migonei* in the transmission of *L. infantum* [6], and more recent studies have reinforced this hypothesis [7, 9]. In VL foci in northeast Brazil and northeast Argentina, *L. migonei* was reported as a predominant species associated with human and canine cases in the peridomestic environment [7, 9]. Additionally, some investigations have reported the detection of *L. infantum* DNA in this sand fly species [8, 10], highlighting the need for additional evidence in order to confirm *L. migonei* as a vector of *L. infantum*.

Lutzomyia migonei is widespread in South America, including Brazil, and shows adaptability to modified environments, being found in human dwellings and animal shelters [11, 12]. This sand fly species displays anthropophilic behaviour and has opportunistic feeding habits, including on dogs, chickens, equines and wild animals [11, 13]. Furthermore, *L. migonei* has been implicated as a vector of *L. (V.) braziliensis*, the etiological agent of cutaneous leishmaniasis in different Brazilian regions [11, 14, 15].

Despite the epidemiological and behavioural characteristics that indicate the participation of *L. migonei* in the transmission cycle of *L. infantum*, no studies have assessed the ability of this species to support the full development of the parasite. From this perspective, therefore, we evaluate for the first time the susceptibility of freshly colonised specimens of *L. migonei* to experimental infection by *L. infantum*.

Methods

Sand fly colonies and *Leishmania* strains

A colony of *Lutzomyia migonei* was established at Charles University in Prague from specimens captured in Baturité municipality, Ceará state, northeast Brazil (04°19'41"S, 38°53'05"W). An already-established laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (from Jacobina, Brazil) with well-known susceptibility to *L. infantum* [16–18] was used as a control. Both colonies were maintained under standard conditions as previously described [19].

A viscerotropic *Leishmania infantum* strain (MHOM/BR/76/M4192) [20] and dermatropic *L. infantum* strain (ITOB/TR/2005/CUK3) [21] were maintained at 23 °C on Medium 199 (Sigma) supplemented with 10 % foetal calf serum (Gibco), 1 % BME vitamins (Sigma), 2 % human urine and 250 µg/ml amikicin (Amikin, Bristol-Myers Squibb).

Experimental infections of sand flies

Sand fly females (2 to 6 days old) were fed through a chick-skin membrane on heat-inactivated rabbit blood containing 10⁶ promastigotes/ml. The experiments were

conducted with three sand fly-*Leishmania* combinations: *L. migonei*-CUK3, *L. migonei*-M4192, and *L. longipalpis*-M4192. A fourth combination, the CUK3 strain in *L. longipalpis*, was previously studied in detail [18]. Engorged females were separated and maintained in the same conditions as the colony and dissected on days 1, 5 and 8 post-infection (PI). Individual guts were placed into a drop of saline and examined microscopically for the localisation and intensity of *Leishmania* infections. Parasite loads were graded according to Myskova et al. [22] as light (<100 parasites per gut), moderate (100 to 1000 parasites per gut) and heavy (>1000 parasites per gut). The experiment was repeated five times. Data were evaluated statistically by means of the Fisher's exact or Chi-square (χ^2) tests using SPSS statistics 23 software.

Morphometry of parasites

Smears from midguts of *L. migonei* and *L. longipalpis* infected with *L. infantum* on days 5 and 8 PI were fixed with methanol, stained with Giemsa, examined under a light microscope with an oil-immersion objective and photographed with an Olympus D70 camera. Body length, body width and flagellar length of 240 randomly selected promastigotes from six females/smears were measured for each sand fly species and time interval using Image-J software. The morphological forms were distinguished according to Walters [23] and Cihakova & Volf [24]: (i) short nectomonads: body length < 14 µm and flagellar length < 2 times body length; (ii) long nectomonads: body length ≥ 14 µm; (iii) metacyclic promastigotes: body length < 14 µm and flagellar length ≥ 2 times body length. Data were evaluated statistically by analysis of variance using SPSS statistics 23 software.

Ethical approval

Animals were maintained and handled in the animal facility of Charles University in Prague in accordance with institutional guidelines and Czech legislation (Act No. 246/1992 and 359/2012 coll. on Protection of Animals against Cruelty in present statutes at large), which complies with all relevant EU guidelines for experimental animals. All experiments were approved by the Committee on the Ethics of Laboratory Experiments of the Charles University in Prague and were performed under the Certificate of Competency (Registration Number: CZ 03069).

Results

Susceptibility of *Lutzomyia migonei* and *L. longipalpis* to *Leishmania infantum*

The development of two strains of *L. infantum* was studied in *L. migonei* and *L. longipalpis* from day 1 to day 8 PI. On day 1 PI, midgut infection rates were high in all parasite-vector combination (75–95 %), with parasites located in the endoperitrophic space within the

bloodmeal surrounded by the peritrophic matrix (PM). The parasites developed similarly and no significant differences were found in infection rates ($\chi^2 = 2.84$, $df = 2$, $P = 0.24$) or intensities of infection ($\chi^2 = 5.7$, $df = 6$, $P = 0.45$; Fig. 1).

On day 5 PI, when the bloodmeal was digested and remnants defecated in both species, infection rates remained high (above 80 %) and most infections were heavy in all parasite-vector combinations evaluated. Parasites migrated anteriorly to colonise the thoracic midgut and cardia region in 43 % of *L. migonei*-CUK3, 31 % of *L. migonei*-M4192 and 44 % of *L. longipalpis*-M4192. The colonisation of the stomodeal valve was observed most frequently in *L. migonei*-CUK3 (35 % of infected females), followed by *L. migonei*-M4192 (34 % of infected females) and *L. longipalpis*-M4192 (27 % of infected females). Statistical analysis did not show any significant differences in the localisation of infections between the experimental groups ($\chi^2 = 2.3$, $df = 6$, $P = 0.88$; Fig. 2).

On day 8 PI, both *L. infantum* strains continued to develop successfully in *L. migonei* and *L. longipalpis*. In all parasite-vector combinations, infection rates were above 75 % and parasites developed heavy late-stage infections in the majority of infected females. The colonisation of the stomodeal valve was observed in 45 % of *L. migonei*-CUK3 and *L. longipalpis*-M4192 and 35 % of *L. migonei*-M4192. Similarly, no significant differences were observed in the localisation of infections ($\chi^2 = 1.9$, $df = 4$, $P = 0.74$). Light microscopy showed a mass of *Leishmania* promastigotes in

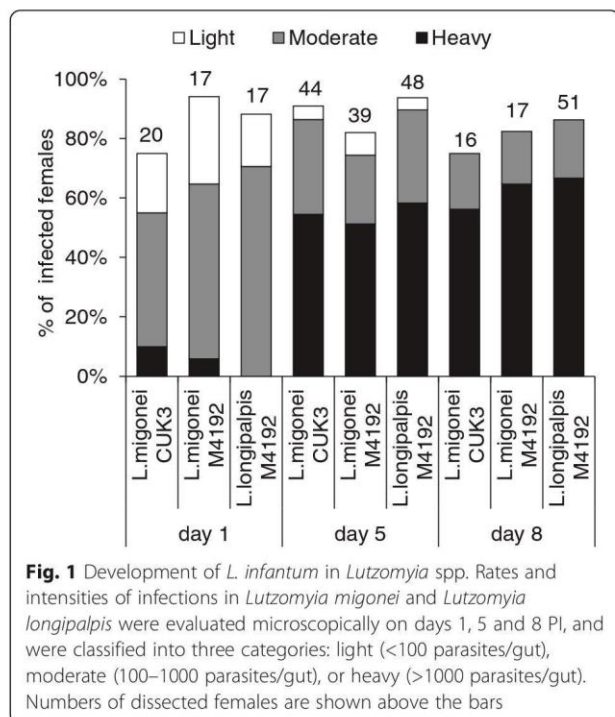


Fig. 1 Development of *L. infantum* in *Lutzomyia* spp. Rates and intensities of infections in *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis* were evaluated microscopically on days 1, 5 and 8 PI, and were classified into three categories: light (<100 parasites/gut), moderate (100–1000 parasites/gut), or heavy (>1000 parasites/gut). Numbers of dissected females are shown above the bars

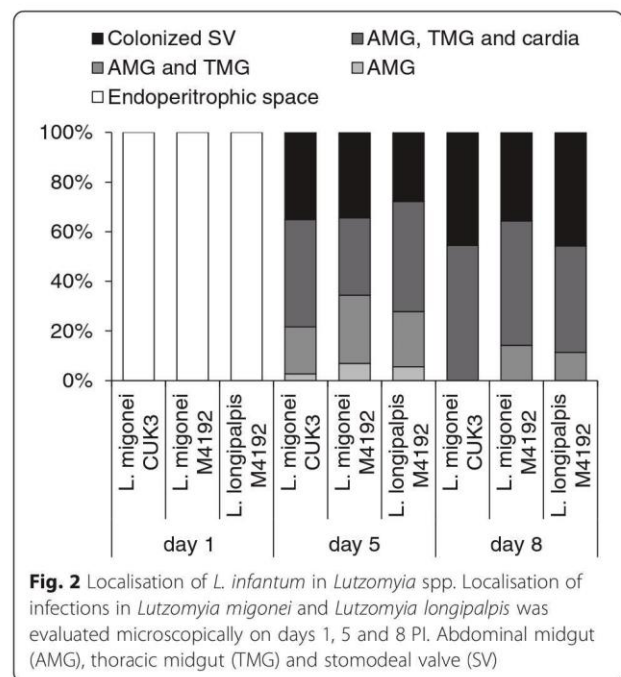


Fig. 2 Localisation of *L. infantum* in *Lutzomyia* spp. Localisation of infections in *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis* was evaluated microscopically on days 1, 5 and 8 PI. Abdominal midgut (AMG), thoracic midgut (TMG) and stomodeal valve (SV)

the cardia region and attached to the stomodeal valve of females. In dissected midguts, this parasite mass accompanied by promastigote-secretory gel erupted from the valve (Fig. 3).

Morphometric analysis of *L. infantum* promastigotes in *L. migonei* and *L. longipalpis*

Morphological analysis was performed on *L. infantum* parasites from *L. migonei* and *L. longipalpis* on days 5 and 8 PI. Differences in all parameters analysed, i.e. body length, body width and flagellar length, from all parasite-vector combinations are summarized in Table 1.

On day 5 PI, slight differences were found between the development of various parasite strains: in *L. migonei* (52 %) and *L. longipalpis* (71 %) infected by *L. infantum* M4192 the majority of parasites were long nectomonads, while in *L. migonei* infected by *L. infantum* CUK3, 64 % of the parasites were short nectomonads. The metacyclic forms were found in all parasite-vector combinations but in low numbers, from 1 to 3 %. Differences in promastigote stages between *Leishmania*-vector combinations were statistically significant ($\chi^2 = 74.5$, $df = 4$, $P < 0.001$; Fig. 4).

On day 8 PI, parasites developed similarly and the percentage of metacyclic forms increased in all three combinations studied. There were no significant differences in the morphological forms of *L. infantum* M4192 and CUK3 in *L. migonei* females ($\chi^2 = 3.3$, $df = 2$, $P = 0.18$). As expected, the percentage of long nectomonads decreased, while the short nectomonad forms increased to 78 % and 75 %, respectively. The metacyclic forms were found in 7.5 % and 5 % for M4192 and CUK3,

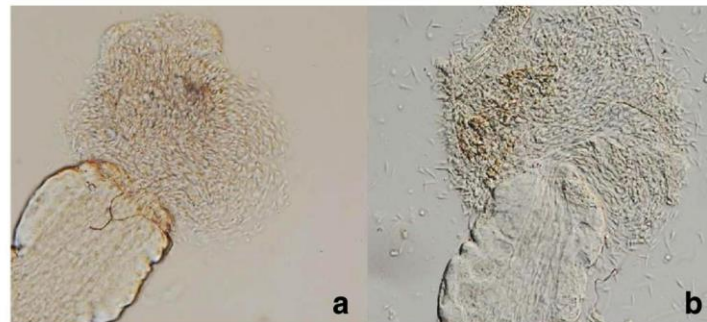
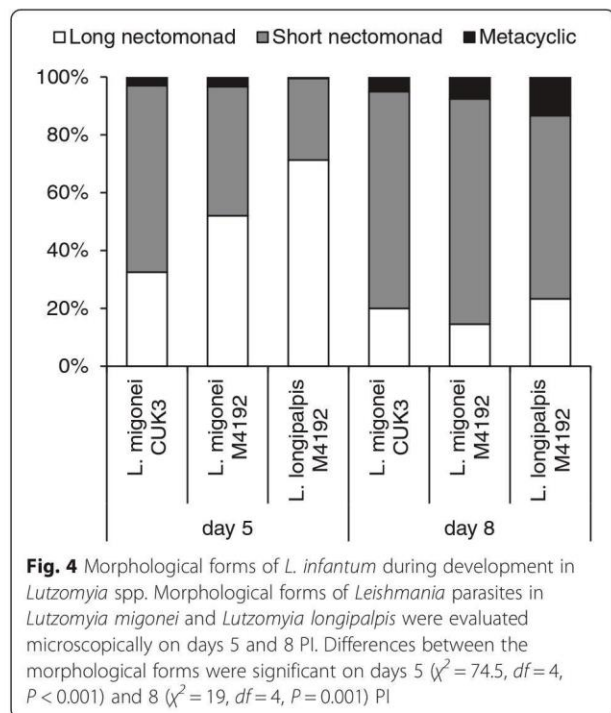


Fig. 3 Thoracic midgut with cardia section and stomodeal valve of *Lutzomyia migonei* females. **a** Infection of *L. infantum* CUK3 on day 5 PI. **b** Infection of *L. infantum* M4192 on day 8 PI

Table 1 Dimensions of the morphological forms of *L. infantum* described in Fig. 4 during development in *L. migonei* and *L. longipalpis* on days 5 and 8 PI

Day PI	Parasite-vector combination	Morphological form	n	Body length		Body width		Flagellar length	
				Mean (SD) (µm)	Range (µm)	Mean (SD) (µm)	Range (µm)	Mean (SD) (µm)	Range (µm)
5	<i>L. migonei</i> -CUK3	LN	78	15.8 (1.4)	14.0–19.1	2.4 (0.4)	1.6–3.7	17.6 (3.5)	7.0–26.1
		SN	155	10.4 (2.0)	5.9–13.8	2.3 (0.5)	1.2–3.7	13.7 (3.4)	5.5–24.2
		MP	7	8.2 (1.2)	6.4–9.9	2.6 (0.5)	1.9–3.6	19.0 (4.5)	13.8–24.8
		Total	240	12.1 (3.1)	5.9–19.1	2.4 (0.5)	1.2–3.7	15.1 (3.9)	5.5–26.1
	<i>L. migonei</i> -M4192	LN	125	16.1 (1.5)	14.0–20.9	2.6 (0.5)	1.7–4.2	18.1 (4.5)	6.1–31.7
		SN	107	11.7 (1.7)	6.8–13.9	2.6 (0.6)	1.4–5.9	15.7 (4.8)	6.8–27.7
		MP	8	8.5 (0.6)	7.7–9.8	2.7 (1.1)	1.4–5.2	20.3 (3.5)	15.4–25.1
		Total	240	13.9 (2.8)	6.8–20.9	2.6 (0.6)	1.4–5.9	17.1 (4.8)	6.1–31.7
	<i>L. longipalpis</i> -M4192	LN	171	17.5 (3.0)	14.0–26.8	2.4 (0.5)	1.0–3.8	22.0 (6.0)	4.5–36.8
		SN	68	11.2 (1.8)	7.0–13.9	2.4 (0.5)	1.1–3.8	14.8 (4.5)	7.9–24.1
		MP	1	13.7		2.3		28.0	
		Total	240	15.7 (3.9)	7.0–26.8	2.4 (0.5)	1.0–3.8	20.0 (6.5)	4.5–36.8
8	<i>L. migonei</i> -CUK3	LN	48	16.0 (2.0)	14.0–22.1	2.4 (0.5)	1.5–3.8	16.2 (2.7)	9.6–21.7
		SN	180	10.2 (2.0)	5.0–13.9	2.1 (0.6)	1.0–4.4	13.5 (3.2)	5.4–24.1
		MP	12	6.6 (1.4)	3.6–8.8	1.8 (0.5)	1.1–3.0	15.7 (2.9)	8.7–19.2
		Total	240	11.2 (3.2)	3.6–22.1	2.1 (0.6)	1.0–4.4	14.2 (3.3)	5.4–24.1
	<i>L. migonei</i> -M4192	LN	35	15.4 (1.1)	14.0–18.1	2.2 (0.4)	1.4–3.3	16.1 (4.1)	8.0–24.0
		SN	187	9.8 (2.1)	5.4–13.9	2.4 (0.5)	1.1–4.1	13.4 (3.5)	3.7–24.0
		MP	18	6.9 (1.2)	5.0–10.3	2.1 (0.7)	1.2–3.8	16.4 (2.0)	13.5–22.2
		Total	240	10.4 (2.9)	5.0–18.1	2.3 (0.5)	1.1–4.1	14.0 (3.7)	3.7–24.0
	<i>L. longipalpis</i> -M4192	LN	56	15.9 (1.3)	14.0–19.2	2.2 (0.4)	1.6–3.4	18.1 (4.1)	8.2–28.4
		SN	152	10.5 (1.9)	6.4–13.9	2.2 (0.6)	1.1–4.6	14.4 (3.1)	7.3–22.8
		MP	32	7.3 (1.3)	5.1–12.2	2.1 (0.8)	1.1–5.6	16.4 (2.5)	12.7–26.3
		Total	240	11.3 (3.2)	5.1–19.2	2.2 (0.8)	1.1–5.6	15.5 (3.6)	7.3–28.4

LN Long nectomonads, SP short promastigotes MP metacyclic promastigotes
 Promastigotes from gut smears were measured under light microscopy with an oil-immersion objective



respectively. In *L. longipalpis*, the proportion of morphological forms differed: the proportion of short nectomonads was lower while metacyclic forms were more numerous (23 % long nectomonads, 63 % short nectomonads and 13 % metacyclic forms; $\chi^2 = 19.0$, $df = 4$, $P = 0.001$).

Discussion

Although *Leishmania*-vector interaction studies are crucial for understanding the parasite transmission and epidemiology of leishmaniases, only a limited number of New World sand fly species have been evaluated experimentally for susceptibility to *Leishmania* spp. The development of *L. infantum* has been studied repeatedly in *L. longipalpis* (e.g. [16, 18, 25, 26]), but information about the vector competence of other species of *Lutzomyia* to this parasite remain unclear.

Here we show for the first time the high susceptibility of *L. migonei* to viscerotropic (M4192) and dermatotropic (CUK3) strains of *L. infantum*. The parasites survived bloodmeal digestion, avoided expulsion during the defecation process, established late-stage infections in the midgut, and colonised the thoracic midgut and stomodeal valve of sand fly females, which is the prerequisite for successful transmission by bite [26–28]. Furthermore, the development of both *L. infantum* strains in *L. migonei* was similar, and no significant differences were found in comparison with the development in *L. longipalpis*. The parasites developed relatively quickly, with the presence of metacyclic promastigotes

and colonisation of the stomodeal valve already on day 5 PI. At the late-stage infection (on day 8 PI), high numbers of the parasites colonised the midgut cardia and stomodeal valve in females of both species.

In *L. migonei*, the dermatropic CUK3 strain morphologically transformed slightly faster than the viscerotropic M4192 strain, with a slightly higher percentage of short nectomonads in CUK3 observed on day 5 PI. However, similar numbers of metacyclic promastigotes were found in both parasite-vector combinations. The percentage of metacyclic forms (5–7.5 %) observed in *L. migonei* on day 8 is comparable to the percentage of metacyclics previously reported for the *L. infantum*-*L. longipalpis* combination [29, 30].

According to Maroli et al. [1], incriminating a sand fly species as a vector must be based on an epidemiological context and there must exist a relationship between the geographical distribution of the vector and the record of human cases of the disease, as well as proof of the anthropophily of the species and the vector’s ability to support infection with the same parasite species occurring in humans. *Lutzomyia migonei* is well-known for its opportunistic feeding habits and anthropophilic behaviour [11, 13] and has repeatedly been found to be naturally infected by *L. infantum* in Brazil [8] and Argentina [10]. In this context, our demonstration of the high susceptibility of *L. migonei* to infection by *L. infantum* M4192 is crucial for the epidemiology of VL in Latin America, since this *L. infantum* strain was isolated in northeast Brazil from a patient with VL.

Sand flies have been classified as permissive or specific vectors on account of their capability to support the development of either a wide or limited spectrum of *Leishmania* spp., respectively [27, 28, 31]. Since it has been reported that *L. migonei* supports the development of other species of *Leishmania*, namely *L. braziliensis* and *L. amazonensis* [32], we propose that this sand fly species is a permissive vector.

Conclusions

This study provides experimental evidence that *L. infantum* develops late-stage infections in *L. migonei*. These results contribute to a better understanding of the role of this sand fly species in the epidemiology of VL caused by *L. infantum*, and allows estimations of the risk of new VL foci in South America. Furthermore, this knowledge is critical for the development of more specific and effective control strategies in endemic areas.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors’ contributions

VCFVG collected the sand flies, carried out the morphometry of parasites and wrote the first draft of the manuscript. KP carried out the sand fly infections and dissections, contributed to data analysis, interpretation and revision of

the manuscript. VCFVG and JM participated in the sand fly dissections. VV established the *L. migonei* colony. JS participated in colony maintenance and carried out the statistical analysis. SPBF and PV participated in the design of the study and contributed with revision of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

Thanks to Pietra Costa, Débora Miranda and Fernando Silva for their support with the field work and to Kyldman Silva for her assistance with *L. migonei* colony in Brazil. This research was supported by PVE-CsF/CNPq grant 400699/2014-1 and UNCE (University Research Centre) 204017/2012.

Author details

¹Department of Immunology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil. ²Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.

Received: 28 January 2016 Accepted: 10 March 2016
Published online: 17 March 2016

References

1. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27:127–47.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7:e3567.
3. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e584.
4. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:811–27.
5. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4:1–24.
6. Souza MB, Marzochi MC, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica.* 2003;19:109–18.
7. Carvalho MR, Lima BS, Marinho-Júnior JF, Silva FJ, Valença HF, Almeida FA, et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest Region of Pernambuco State. *Brazil Cad Saude Publica.* 2007;23:1227–32.
8. Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 2010;116:108–10.
9. Salomon OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop.* 2010;113:84–7.
10. Moya SL, Giuliani MG, Manteca MA, Salomón OD, Liotta DJ. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. *Acta Trop.* 2015;152:181–4.
11. 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.* 2009;104:937–54.
12. Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AI, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:66–70.
13. Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987;82:583–4.
14. Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, Santana AL, Costa SM, Costa Rego TA, et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors.* 2013;6:325.
15. Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Melo FL, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56:357–60.

16. Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votupka J, Volf P. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatotropic strain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1181.
17. Sadlova J, Dvorak V, Seblova V, Warburg A, Votupka J, Volf P. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasit Vectors.* 2013;6:186.
18. Seblova V, Myskova J, Hlavacova J, Votupka J, Antoniou M, Volf P. Natural hybrid of *Leishmania infantum/L.donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with nonhybrid strains differing in tissue tropism. *Parasit Vectors.* 2015;8:605.
19. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol.* 2011;36 Suppl 1:S1–9.
20. Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R. *Leishmania chagasi*: Genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol.* 1997;85:264–73.
21. Svobodova M, Alten B, Zidkova L, Dvorak V, Hlavackova J, Myskova J, et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol.* 2009;39:251–56.
22. Myskova J, Votupka J, Volf P. *Leishmania* in sand flies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *J Med Entomol.* 2008;45:133–8.
23. Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Eukaryot Microbiol.* 1993;40:196–206.
24. Cihakova J, Volf P. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997;91:267–79.
25. Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1988;63:134–45.
26. Rogers ME, Bates PA. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 2007;3:e91.
27. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006;22:439–45.
28. Dostalova A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors.* 2012;5:276.
29. Elnaiem DA, Ward RD, Young PE. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood-meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasitol Res.* 1994;80:414–9.
30. Freitas VC, Parreiras KP, Duarte AP, Secundino NF, Pimenta PF. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:606–12.
31. Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.* 2007;23:91–2.
32. Nieves E, Pimenta PF. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 2000;37:134–40.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

