

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

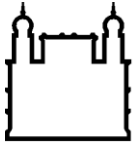
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Estudo de parâmetros fisiológicos de *Lutzomyia longipalpis*: avaliação do efeito de compostos anti-*Leishmania* e determinação de idade

Tainá Neves Ferreira

Rio de Janeiro

Junho de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Tainá Neves Ferreira

Estudo de parâmetros fisiológicos de *Lutzomyia Longipalpis*: avaliação do efeito de compostos anti-*Leishmania* e determinação de idade

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

RIO DE JANEIRO

Junho de 2022

Neves Ferreira , Tainá .

Estudo de parâmetros fisiológicos de *Lutzomyia longipalpis*: avaliação do efeito de compostos anti-*Leishmania* e determinação de idade / Tainá Neves Ferreira . - Rio de Janeiro, 2022.

187 f.

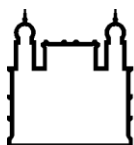
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientador: Fernando Ariel Genta.

Bibliografia: f. 154-173

1. *Lutzomyia Longipalpis*. 2. Flebotomíneos. 3. Drogas. 4. *Leishmania*. 5. Longevidade . I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Tainá Neves Ferreira

Estudo de parâmetros fisiológicos de *Lutzomyia Longipalpis*: avaliação do efeito de compostos anti-*Leishmania* e determinação da idade de insetos adultos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

Aprovada em: 27/06/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr.^a Luciana Ordunha Araripe - IOC/FIOCRUZ (presidente)

Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez – UFF (Titular)

Prof. Dr. Mauricio Viana Sant'Anna – UFMG/ MG (Titular)

Prof. Dr.^a Rafaela Vieira Bruno - IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Prof. Dr.^a Patrícia Fampa Negreiros Lima - UFRRJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 27 de junho de 2022

Dedico esta tese a todos os mestres que fizeram parte da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que mesmo diante de tantas inseguranças e incertezas iluminou meus caminhos para que essa conquista se tornasse realidade.

Ao meu orientador, Dr. Fernando Genta por mais uma vez acreditar na minha capacidade. Agradeço pelos ensinamentos, discussões científicas, suporte e pelos sorrisos mesmo nos momentos em que tudo parecia perdido.

A Dr.^a Luciana Araripe que dedicou seu tempo para ajudar nas correções deste trabalho e aos componentes da banca que se disponibilizaram e aceitaram o convite de avaliar a minha tese.

Agradeço aos Dr.^a Clélia, Dr. Reginaldo Brazil, Dr. Rafael Freitas, Dr.^a MaryAnn MacDowel pela colaboração e disponibilidade que ajudaram na condução desse trabalho.

Ao Dr. Hector Dias Albiter, *in memoriam*, que mesmo partindo cedo demais ensinou, inspirou e alegrou a todos que tiveram a oportunidade de conhecê-lo.

Aos companheiros de LABFISI Cecilia Vieira, Raquel Souza, Mariana Cardoso, Rodrigo Miranda e às minhas alunas do programa de vocação científica (PROVOC) Lauanny Brandão e Júlia Zukeram por todo auxílio e momentos de troca que compartilhamos.

Agradeço especialmente a Carol Moraes, Samara Latgé, Maiara Gama e Bianca Carvalho por toda troca de ideias, apoio, carinho e amizade ao longo desses anos.

Ao Programa de pós-graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária, aos coordenadores Rafael e André, à Comissão de pós-graduação e à secretária Rita Gomes.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida acadêmica, pelos ensinamentos.

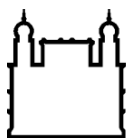
Aos meus pais, Vera e Clodomar, pelo carinho e dedicação recebidos. Em especial a minha mãe que sempre buscou a melhor educação que eu pudesse ter. As minhas queridas irmãs, Tamiris e Larissa, que sempre acreditaram no meu trabalho e comemoraram comigo cada conquista alcançada.

Ao meu marido, Francisco, por tanto apoio, carinho, amizade, companheirismo e amor em tantos momentos de altos e baixos. Sua alegria e otimismo tornaram essa caminhada mais leve.

Agradeço a Capes, CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ pelo suporte financeiro mesmo em tempos tão difíceis.

“Ando devagar, porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais (...)
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz. ”

Almir Sater



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

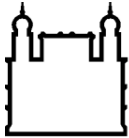
Estudo de parâmetros fisiológicos de *Lutzomyia Longipalpis*: avaliação do efeito de compostos anti-*Leishmania* e determinação da idade de insetos adultos

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Tainá Neves Ferreira

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos pela picada de flebotomíneos. Para controle da transmissão e redução do número de casos é necessário integrar diferentes estratégias, especialmente as que visam o controle vetorial. Os flebotomíneos adultos obtêm energia a partir de açúcares de origem vegetal, e dada a importância dessa dieta, essa característica vem sendo utilizada na elaboração de ferramentas de controle usando iscas açucaradas tóxicas atraentes, ATSB's. Os parasitos desenvolveram formas de superar barreiras e sobreviver dentro do intestino do vetor até seu completo desenvolvimento, mas em estudos recentes verificamos que compostos com efeito antiparasitário *in vitro* também são capazes de reduzir a carga parasitária e a prevalência de infecção. Assim, estudamos o efeito de compostos sintéticos com atividade anti-*Leishmania* em diferentes aspectos da fisiologia de *L. longipalpis*, adicionando-os à dieta açucarada e buscando os candidatos mais promissores para uso em controle de transmissão, afetando a infecção dentro do vetor. Nos testes de atração/repulsão, identificamos que apenas 2 compostos tiveram efeito, um atrativo (L4) e um repulsivo (P9). Em experimentos de ingestão de dieta açucarada contendo drogas, verificamos que L1, L3, L4, L7, P8 e P10 demonstraram um efeito inibidor de alimentação. Quanto à preferência entre as dietas, verificamos que flebotomíneos preferiram a dieta contendo os compostos L2, L7, P8, P9 e P10 em comparação à dieta controle. Nos ensaios de longevidade, L6 e P8 reduziram o tempo médio de vida (TMV) em machos e L2 e P8 fizeram o mesmo em fêmeas. Não foram observados efeitos inibitórios na alimentação sanguínea das fêmeas nem na produção de ovos. O composto L2 foi capaz de reduzir a quantidade de *L. amazonensis* no intestino de *L. longipalpis* no 3º dia após a infecção. O composto L2 parece ser o melhor candidato para o desenvolvimento de uma isca açucarada que minimize a transmissão, por reduzir o TMV de fêmeas e afetar o número de parasitos na infecção. Outro aspecto estudado, que influencia na medida de capacidade vetorial, foi a determinação de idade de flebotomíneos adultos. Através da espectroscopia no infravermelho próximo conseguimos estimar a proporção de flebotomíneos com idade \leq ou \geq 8 dias pós-emergência, com precisão de 83 a 97%. E por análise de marcadores moleculares, identificamos que os genes LL005905 e LL001619 exibem padrão de expressão idade-dependente em *L. longipalpis*, sendo possível construir um modelo com tendência linear em função da menor expressão desses genes em insetos mais velhos. Essas técnicas se mostraram mais eficientes na previsão de idade em comparação às técnicas clássicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of physiological parameters of *Lutzomyia Longipalpis*: evaluation of the effect of anti-*Leishmania* compounds and age determination of adults

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Tainá Neves Ferreira

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, which are transmitted by the bite of sandflies. To control transmission and reduce the number of cases, it is necessary to integrate different strategies, especially those aimed at vector control. Adult sandflies obtain energy from sugars of plant origin, and given the importance of this diet, this characteristic has been used in the development of control tools using attractive toxic sugar baits, ATSB's. The parasites have developed ways to defend themselves and survive inside the vector's intestine until their complete development. In recent studies, we found that compounds with an *in vitro* antiparasitic effect are also able to reduce the number of parasites per insect and the percentage of infection. Thus, we studied the effect of synthetic compounds with anti-*Leishmania* activity on different aspects of *L. longipalpis* physiology, adding them to the sugary diet and looking for the most promising candidates for use in controlling transmission, affecting the infection within the vector. In the attraction/repulsion tests, we identified that only 2 compounds had an effect, one attractant (L4) and one repulsive (P9), when added to the sugar solution. In experiments of ingestion of sugary diets containing drugs, we found that L1, L3, L4, L7, P8 and P10 demonstrated a feeding inhibitory effect. In assays of preferences between diets, sandflies shown us a preference by diets that contained L2, L7, P8, P9, and P10 compared to the control diet. In longevity assays, L6 and P8 reduced the Mean Life Time (MLT) in males and L2 and P8 did the same in females. No inhibitory effects were observed on the blood feeding of the females or on the production of eggs. Compound L2 was able to reduce the amount of *L. amazonensis* in the intestine of *L. longipalpis* on the 3rd day post infection. L2 seems to be the best candidate for the development of a sugar bait that minimizes transmission, by reducing the MLT of females and affecting the number of parasites in the insect. Another aspect studied that influences the vector capacity was the determination of age of adult sandflies post-emergence. Using near-infrared spectroscopy, we estimated the proportion of sandflies aged \leq or \geq 8 days, with an accuracy of 83 to 97%. And by molecular analysis, we identified that the genes LL005905 and LL001619 exhibit an age-dependent pattern of expression in *L. longipalpis*, making it possible to build a model with linear trend as a function of the lower expression of these genes in older insects. These techniques proved to be more efficient in age prediction when compared to classical techniques.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmanioses	1
1.1.1. Leishmaniose Cutânea..	4
1.1.2. Leishmaniose Visceral..	6
1.2. Flebotomíneos	9
1.3. Agente Etiológico e desenvolvimento no vetor	16
1.4. Compostos anti- <i>Leishmania</i>	24
1.4.1. Compostos anti- <i>Leishmania</i> e relação com flebotomíneos	27
1.5. Capacidade Vetorial	28
1.5.1. Técnicas para determinação de idade de flebotomíneos	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	34
3.1. Capítulo 1.....	35
3.2. Capítulo 2.....	50
3.3. Capítulo 3.....	97
3.4. Capítulo 4.....	128
4. DISCUSSÃO GERAL	142
5. PERSPECTIVAS.....	151
6. CONCLUSÕES	152
7. OUTRAS ATIVIDADES.....	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

Índice de Figuras

Figura 1.1. Casos de leishmaniose visceral de 2001 a 2019	3
Figura 1.2. Casos de leishmaniose tegumentar no Brasil de 1980 a 2020.....	5
Figura 1.3. Casos de LV no Brasil e taxa de letalidade por LV	7
Figura 1.4. Mapa de distribuição das áreas prováveis de ocorrência <i>L. longipalpis</i> no Brasil	8
Figura 1.5. Fêmea e macho de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	9
Figura 1.6 - Ciclo de vida de flebotomíneos (<i>L. longipalpis</i>).....	11
Figura 1.7 - Ovos e larvas recém eclodidas de <i>L. longipalpis</i>	12
Figura 1.8 - Forma promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i>	17
Figura 1.9 - Modelo de intestino de um flebotomíneo	18
Figura 1.10 - Esquema do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	21
Figura 1.11 - Esquema do antigo versus novo ciclo de <i>L.infantum</i> no intestino de flebotomíneos.....	22
Figura 1 (artigo 1) – Estrutura geral de metabolitos secundários	37
Figura 2 (artigo 1) – Efeitos atrativos/repulsivos de compostos anti- <i>Leishmania</i> em <i>L. longipalpis</i>	41
Figura 3 (artigo 1) – Efeitos repulsivos de repelente comercial (DEET) em <i>L. longipalpis</i>	42
Figura 4 (artigo 1) – Efeitos repulsivos do DEET mais isca açucarada em <i>L. longipalpis</i>	43
Figura 5 (artigo 1) – Ingestão de soluções açucaradas com compostos anti- <i>Leishmania</i> em <i>L. longipalpis</i>	44
Figura 1 (artigo 2) – PCA de fêmeas não acasaladas de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-3-8-10-15-17 dias, (b) 1-8-15 dias, e (c) < 8 ou ≥ 8 dias.	80
Figura 2 (artigo 2) – PCA de machos não acasalados de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-3-8-10-15-17 dias, (b) 1-8-15 dias e (c) < 8 ou ≥ 8 dias.	81
Figura 3 (artigo 2) – LDA de fêmeas não acasaladas de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-3-8-10-15-17 dias, (b) 1-8-15 dias e (c) < 8 ou ≥ 8 dias.	82
Figura 4 (artigo 2) – LDA de machos não acasalados de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-3-8-10-15-17 dias, (b) 1-8-15 dias e (c) < 8 ou ≥ 8 dias	83
Figura 5 (artigo 2) – PCA de fêmeas acasaladas de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-8-15 dias e (b) < 8 ou > 8 dias	84
Figura 6 (artigo 2) – PCA de machos acasalados de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-8-15 dias e (b) < 8 ou > 8 dias	85

Figura 7 (artigo 2) – LDA de fêmeas acasaladas de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-8-15 dias e (b) < 8 ou > 8 dias	86
Figura 8 (artigo 2) – LDA de machos acasaladas de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (a) 1-8-15 dias e (b) < 8 ou > 8 dias	87
Figura 9 (artigo 2) – PCA e LDA de fêmeas acasaladas vs não acasaladas (a,b) e machos acasalados vs não acasalados (c,d) de <i>L. longipalpis</i>	88
Figura 10 (artigo 2) – PCA e LDA de fêmeas alimentadas com solução de sacarose ou sacarose mais sangue. (a) (b) são resultados considerando fêmeas com ovos não postos e (c) (d) resultam apenas de fêmeas que já puseram ovos	89
Figura suplementar 1 (artigo 2) – Exemplos de espectro para flebotomíneos (<i>L. longipalpis</i>): Absorbância (Log 1/R) versus comprimento de onda	90
Figura 3.3.1 - Curvas de longevidade de machos de <i>L. longipalpis</i> alimentados com solução açucarada mais droga anti- <i>Leishmania</i>	109
Figura 3.3.2 - Curvas de longevidade de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução açucarada mais droga anti- <i>Leishmania</i>	110
Figura 3.3.3 - Efeito de compostos anti- <i>Leishmania</i> adicionados a dieta açucarada em fêmeas de <i>L. longipalpis</i> pré e pós alimentação sanguínea	112
Figura 3.3.4 - Porcentagem de eclosão em grupo de ovos postos por fêmeas pós alimentação sanguínea e açucarada contendo drogas antiparasitárias.	113
Figura 3.3.5 - Quantificação de proteínas do método BCA do sangue do conteúdo intestinal de fêmeas após alimentação sanguínea	114
Figura 3.3.6 - Influência de dieta açucarada com compostos anti- <i>Leishmania</i> sobre a infecção de <i>L. longipalpis</i> com <i>L. amazonensis</i> no 3º dia pós infecção	116
Figura 3.3.7 - Influência de dieta açucarada com compostos anti- <i>Leishmania</i> sobre a infecção de <i>L. longipalpis</i> com <i>L. amazonensis</i> no 5º dia pós infecção	116
Figura 3.3.8 - Influência de dieta açucarada com compostos anti- <i>Leishmania</i> sobre a infecção de <i>L. longipalpis</i> com <i>L. amazonensis</i> no 7º dia pós infecção.	117
Figura 3.4.1 - Variação dos níveis de expressão gênica para fêmeas de <i>L. longipalpis</i> de diferentes idades	137
Figura 3.4.2 – Padrão de expressão dos genes LL005905 e LL001619 de <i>L. longipalpis</i> em diferentes idades (1, 3, 8, 10, 15, 17 dias)	138

Índice de Tabelas

Tabela 1 (artigo 1) - Compostos anti- <i>Leishmania</i> com valores de IC ₅₀ para <i>Leishmania</i> spp.	39
Tabela 2 (artigo 1) - Resumo dos resultados observados com compostos anti- <i>Leishmania</i> em <i>L. longipalpis</i>	46
Tabela 1 (artigo 2) - Classificação das previsões corretas de flebotomíneos adultos (<i>L. longipalpis</i>) de diferentes idades separadas por sexo, com base em LDA	62
Tabela 2 (artigo 2) - Classificação das previsões corretas de flebotomíneos adultos (<i>L. longipalpis</i>) de diferentes idades, com base em LDA	63
Tabela 3 (artigo 2) - Classificação das previsões corretas de flebotomíneos adultos (<i>L. longipalpis</i>) copulados ou não, com base em LDA	64
Tabela 4 (artigo 2) - Classificação das previsões corretas de fêmeas de flebotomíneos (<i>L. longipalpis</i>) alimentadas com em solução açucarada ou açúcar mais sangue	65
Tabela 3.3.1 - Propriedades e condições experimentais dos compostos anti- <i>Leishmania</i>	102
Tabela 3.3.2 - Tempos médios e medianos de vida de <i>L. longipalpis</i>	108
Tabela 3.3.3 - Porcentagens de fêmeas infectadas com <i>L. amazonensis</i> ao longo dos dias pós infecção (PI).....	117
Tabela 3.3.4 - Resumo dos efeitos de drogas antiparasitárias sobre a fisiologia de <i>L. longipalpis</i>	118
Tabela 3.4.1 – Genes de <i>A. aegypti</i> e seus ortólogos em <i>L. longipalpis</i> com expressão idade dependente	131
Tabela 3.4.2 – Parâmetros dos iniciadores desenhados para os genes de <i>L. longipalpis</i>	132

Lista de Siglas e Abreviaturas

OMS- Organização Mundial da Saúde

OPAS –Organização Pan Americana de Saúde

LV – Leishmaniose visceral

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicocanos

PSG – proteofosfoglicanos

MP – Matriz peritrófica

MSP – Metabolitos secundários de plantas

TMV – Tempo médio de vida

DEET - N,N-dimetil-meta-toluamida ou N,N-dietil-3-metilbenzamida

NIRS – *Near-infrared spectroscopy* – Espectroscopia no Infravermelho próximo

CH – *Cuticular hydrocarbons* – Hidrocarbonetos cuticulares

ORN – *Olfactory receptor neurons* – receptor neuronais olfativos

OR – *Odorant receptor*- receptores odorantes

EG – Expressão gênica

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças antropozoonóticas causadas por parasitos de transmissão vetorial. Estão listadas entre as dez mais importantes doenças infecciosas devido à complexidade de seu ciclo transmissão e epidemiologia, apresentando uma grande diversidade de vetores, reservatórios e parasitos envolvidos (Brasil 2014, 2017; OPAS, 2019).

Segundo a OMS (2022), cerca de 12 milhões de pessoas estariam infectadas no mundo, com até 1,6 milhões de novos casos anualmente. Encontra-se em quase todos os continentes afetando principalmente populações carentes em países subdesenvolvidos (OPAS, 2019). Até alguns anos a Oceania era considerada livre de *Leishmania* devido limitação ou ausência de espécies vetoras de flebotomíneos. Entretanto, estudos identificaram marsupiais do norte da Austrália naturalmente infectados por *Leishmania macropodum*, tendo como vetor os culicídeos (*F. Lasiohelea*) sp.) da família Ceratopogonidae (Dougall et al., 2011; Panahi et al., 2020).

Fatores como mudanças climáticas, desmatamento e processos de urbanização desordenados tornam o controle e redução dos casos ainda mais desafiadores (Alvar et al., 2012; OPAS, 2019; Rangel et al., 2018).

Existem três principais formas da leishmaniose: visceral (LV - forma mais perigosa e letal sem o devido tratamento), cutânea (LC - de maior incidência) e mucocutânea (LMC). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (OMS, 2022; OPAS, 2019, 2022).

Um fato alarmante é o aumento no caso de pessoas coinfectadas com *Leishmania* e HIV. Esses pacientes apresentam mais dificuldade de resposta ao tratamento clínico, com altas taxas de recaída e mortalidade. Os maiores números de casos de

coinfecção foram reportados no Brasil, na Etiópia e no estado de Bihar, na Índia (Brasil, 2017; Fernandes et al., 2017; OMS, 2022).

Até 2020, segundo a OMS (2022), os dez países que contribuíram com mais de 90% dos casos de LV foram: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen. A LV é endêmica em 13 países, com uma média de 3.470 casos por ano, de 2001 a 2019. A figura 1.1 traz o número de casos de LV nas Américas, mostrando que, em 2019, do total de casos registrados, 97% (2.529) foram notificados no Brasil (OPAS, 2021).

As manifestações clínicas da LV costumam ser mais agressivas quando comparadas às de LC. No mamífero infectado, após sua replicação, os parasitos alcançam órgãos e tecidos hematopoiéticos (baço, fígado e medula óssea), onde ocorrerá multiplicação e infecção dos macrófagos locais. Com a alteração de funcionalidade desses órgãos e tecidos, uma lesão sistêmica se inicia e provoca o crescimento de órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, caracterizado por hepatoesplenomegalia (OPAS, 2019).

Os sinais clínicos podem variar com o indivíduo infectado e também com o período da doença (fase aguda ou final). Os mais recorrentes são: febre, palidez cutaneomucosa e hepatoesplenomegalia, desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores podendo evoluir para anasarca, sendo os dois últimos característicos de fase final. Em outras palavras, pode ir desde a forma assintomática até casos mais graves com possibilidade de óbito sem o devido tratamento (Brasil, 2014; OPAS, 2019).

A LV afeta especialmente crianças com menos cinco anos, estando muitas vezes associada a deficiências nutricionais ou outras condições imunossupressoras (Brasil, 2014). O número de casos de LV também vem aumentando em países desenvolvidos e não endêmicos. A explicação mais provável se deve à ampliação do turismo internacional, afluxo de imigrantes provenientes de regiões endêmicas e operações militares (Mansueto, Seidita, Vitale, & Cascio, 2014).

Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* apresentam grande de importância médica no Brasil por sua capacidade vetorial desde os primeiros casos de LV descritos no país, em 1913 (Brasil, 2014; Brazil & Brazil, 2018).

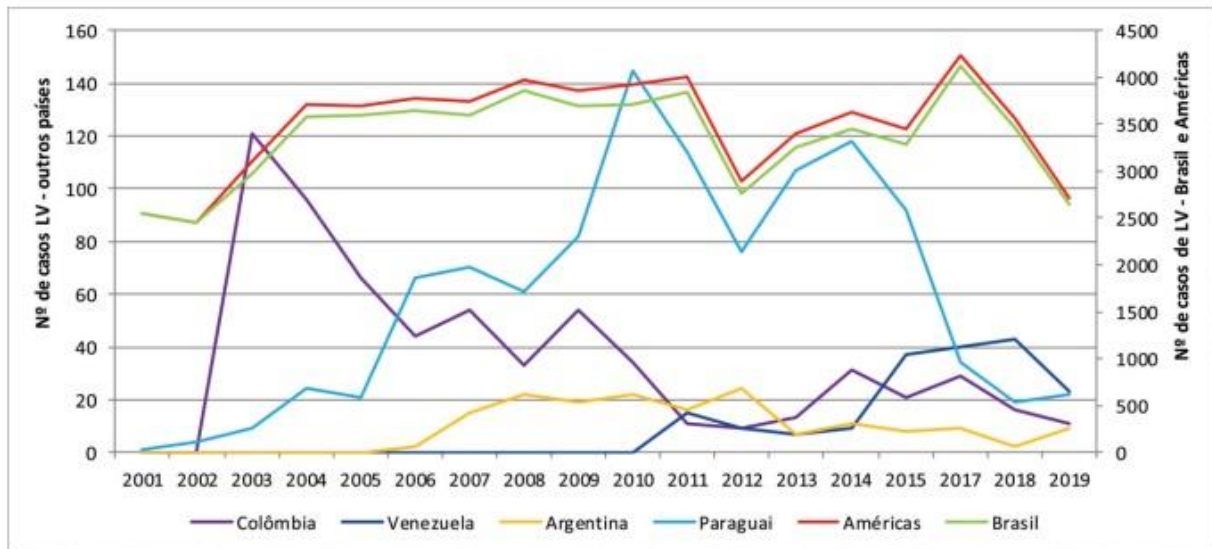


Figura 1.1 - Casos de leishmaniose visceral de 2001 a 2019 nos países com o maior número de casos nas Américas. Fonte: Informe Epidemiológico das Américas, OPAS, 2021.

A LC é uma doença infecciosa, não contagiosa que atinge pele e mucosas. A manifestação clínica da doença depende do estado imunológico da pessoa infectada, mas, em geral, os sinais mais frequentes são algumas lesões em áreas expostas da pele, indolores, de formato arredondado medindo até alguns centímetros. Em casos mais raros, essas lesões podem ser numerosas (leishmaniose cutânea disseminada) e infecções bacterianas secundárias podem causar dor local e piora no aspecto da lesão (Brasil, 2017; OPAS, 2019).

Com relação à LC, cerca de 95% dos casos originam-se nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Em 2020, os novos casos concentraram-se em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia (OMS, 2022).

Os flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*) são os insetos vetores dos parasitos causadores das leishmanioses, destacando-se os gêneros *Phlebotomus*

(Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Young & Duncan, 1994; Torres-Guerrero et al., 2018). A transmissão se dá quando as fêmeas infectadas, em uma primeira alimentação sanguínea, buscam mamíferos para realizar uma nova alimentação necessária para desenvolvimento e postura dos ovos e transmitem as formas infectivas do parasito durante a picada (Brazil & Brazil, 2018; Soares & Turco, 2003; Steverding, 2017; Torres-Guerrero et al., 2018).

As espécies de flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* são as responsáveis pela dispersão de *Leishmania* spp. nas Américas (Galati, 2003; Marcondes, 2007; Costa & Souza, 2018).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania*, sendo reconhecidas 22 espécies como patogênicas para humanos. São várias as espécies envolvidas nos diferentes tipos de leishmanioses, mas nas Américas podemos destacar *L. infantum*, causadora da LV, *L. guyanensis* e *L. amazonenses*, causadoras de LC e *L. braziliensis*, causadora da forma mucocutânea (Brasil, 2017; Neghina & Neghina, 2010; OPAS, 2019; Ready, 2013).

Esses patógenos têm como reservatórios silvestres (hospedeiros vertebrados) algumas espécies de roedores (ex.: *Bolomys lasiurus*, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e canídeos. Em áreas urbanas os animais domésticos como cães e gatos podem atuar como reservatórios das espécies do parasito, sendo o cão (*Canis familiaris*) considerado a principal fonte (Brasil, 2014, 2017).

1.1.1. Leishmaniose Cutânea

Segundo o informe epidemiológico da OPAS, de 2001 a 2019, 1.028.054 casos de LC e LMC foram informados por 17 dos 18 países endêmicos das Américas, compondo uma média de 54.108 casos/ano. Em 2019, o número de casos nas Américas foi de 41.617, atingindo o menor quantitativo registrado desde 2001. Os países que mais contribuíram com esse número de notificações foram: Brasil

(15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052), que somados representam 77% dos casos (OPAS, 2021).

Dados do Ministério da Saúde mostram que o número de casos anuais de LC de 2018 a 2020 se manteve acima de 15.000. O pico da série histórica foi no ano de 1995 com mais de 35.000 casos registrados, como ilustrado na Figura 1.2.



Figura 1.2 – Casos de leishmaniose tegumentar no Brasil de 1980 a 2020.

Fonte: SVS/MS.

Os primeiros relatos de leishmaniose cutânea no Brasil ocorreram no início do século XX, em trabalhadores na construção de rodovias, em áreas de desmatamento no interior de SP. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença, e Gaspar Vianna identificou o parasito, chamando-o de *Leishmania braziliensis* (Brasil, 2007, 2017).

No Brasil, até o momento, 11 espécies de *Leishmania* são reconhecidas como dermatrópicas e causadoras de doença humana. Das sete espécies já identificadas, seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) amazonensis*; *L. (Viannia) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.)*

lainsoni; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) naiffi*; e *L. (V.) lindenbergi*) (Brasil, 2017; Rangel et al., 2018).

As principais espécies de vetores relacionadas à transmissão são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai* e *Lutzomyia gomezi* que estão amplamente difundidas por todo o país (Brasil, 2017; OPAS, 2019; Rangel et al., 2018).

O controle de LC no Brasil vem sendo um grande desafio devido à diversidade de agentes etiológicos, de reservatórios e de vetores. Assim, para melhor sucesso em intervenções em áreas endêmicas é preciso haver vigilância e o monitoramento local, bem como levantamento de suas características ambientais, sociais e econômicas que podem ser favoráveis a cada padrão de transmissão (Brasil, 2017; OPAS, 2019).

1.1.2. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é endêmica em 13 países das Américas, apresentando uma média de 3.470 casos por ano, avaliando de 2001 a 2019. Do total de casos reportados em 2019, 97% (2.529) foram notificados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS, 2021).

Segundo dados do Ministério da Saúde, houve uma queda expressiva no número de casos de 2018 a 2020, indo de cerca de 4000 para 2000 casos. Entretanto o mesmo não aconteceu com a taxa de letalidade no mesmo período que foi de 8,9 para 9,5%, conforme ilustrado na Figura 1.3.

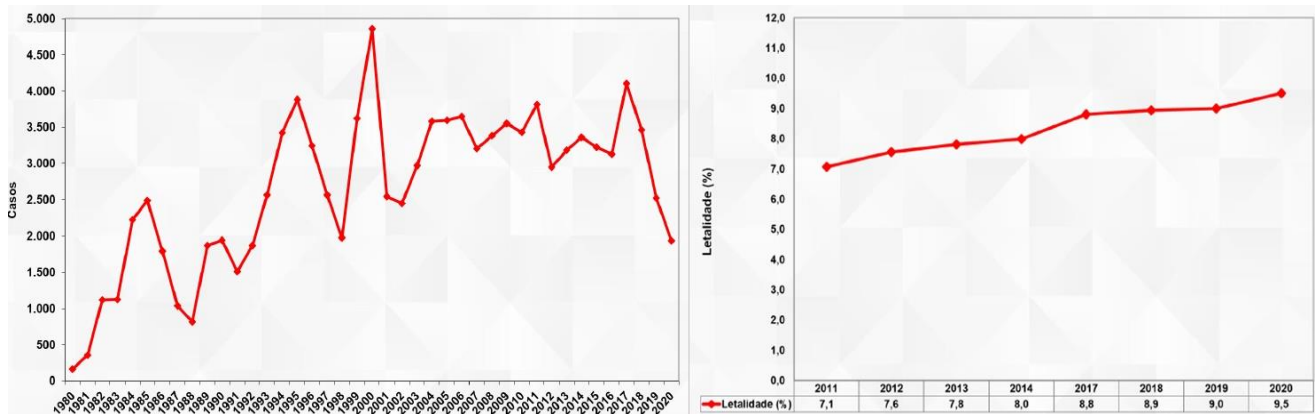


Figura 1.3 - Casos de LV no Brasil de 1980 a 2020 (à esquerda) e taxa de letalidade por LV no Brasil de 2011 a 2020 (à direita). Fonte: SVS/MS.

O padrão de transmissão até a década de 90 era predominante em ambientes rurais e periurbanos, principalmente na região nordeste que concentrava cerca de 85% dos casos, incluindo o primeiro relato de LV no Brasil, nas cidades de Teresina, Piauí, e São Luís, Maranhão (MA) (Arias et al., 1996; Salomón et al., 2015). Entretanto, os casos LV avançaram para estados do Centro-Oeste, Norte e Sudeste, com casos reportados em cidades como: Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS) e Campo Grande (MS), fenômeno ocasionado por problemas socioeconômicos, processos de urbanização desordenados, desmatamento, migração de populações com seus animais de domésticos de áreas endêmicas para urbanas e condições sanitárias precárias (Brasil, 2014; Maia-elkhoury, Albuquerque, & Salomón, 2018; Salomón et al., 2015).

A LV no Brasil, é causada por *L. infantum* tendo *L. longipalpis* e *L. cruzi* como vetores, sendo *L. longipalpis* o vetor primário (Brasil 2014; Maia-elkhoury et al. 2018).

Na maioria dos casos, a expansão geográfica de *L. longipalpis* precedeu o surgimento ou aumento da LV no Brasil, sendo o vetor o principal responsável pelo estabelecimento da doença em cidades de médio e grande porte (Rangel, Lainson, Afonso, et al. 2018). *L. longipalpis* vem se adaptando aos ambientes modificados pelo homem, pois inicialmente essa espécie era encontrada em regiões de mata do Norte

e Nordeste, compondo o ciclo primário de transmissão da doença. Posteriormente adaptaram-se aos ambientes rurais o que foi favorecido pela presença animais sinantrópicos e silvestres. E foi a partir da década de 90 que se detectou uma nova adaptação do inseto nas áreas urbanas, especialmente região Sudeste. *Lutzomyia longipalpis* acomodou-se com facilidade ao peridomicílio, podendo ser encontrada dentro dos domicílios ou em abrigos de animais domésticos (galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, etc.) (Brasil 2014; Maia-elkhoury et al. 2018; Salomón et al. 2015).

Fatores climáticos também podem influenciar na dispersão do vetor e na dispersão de cães infectados em áreas endêmicas, já que temperatura e umidade afetam sobrevivência e reprodução do vetor, assim como o desenvolvimento dos parasitos (Lorenz, Azevedo, & Chiaravalloti-Neto, 2019; Semenza & Suk, 2018). A figura 1.4 mostra as áreas prováveis de ocorrência atual de *L. longipalpis* no Brasil, por Lorenz e cols. (2019).

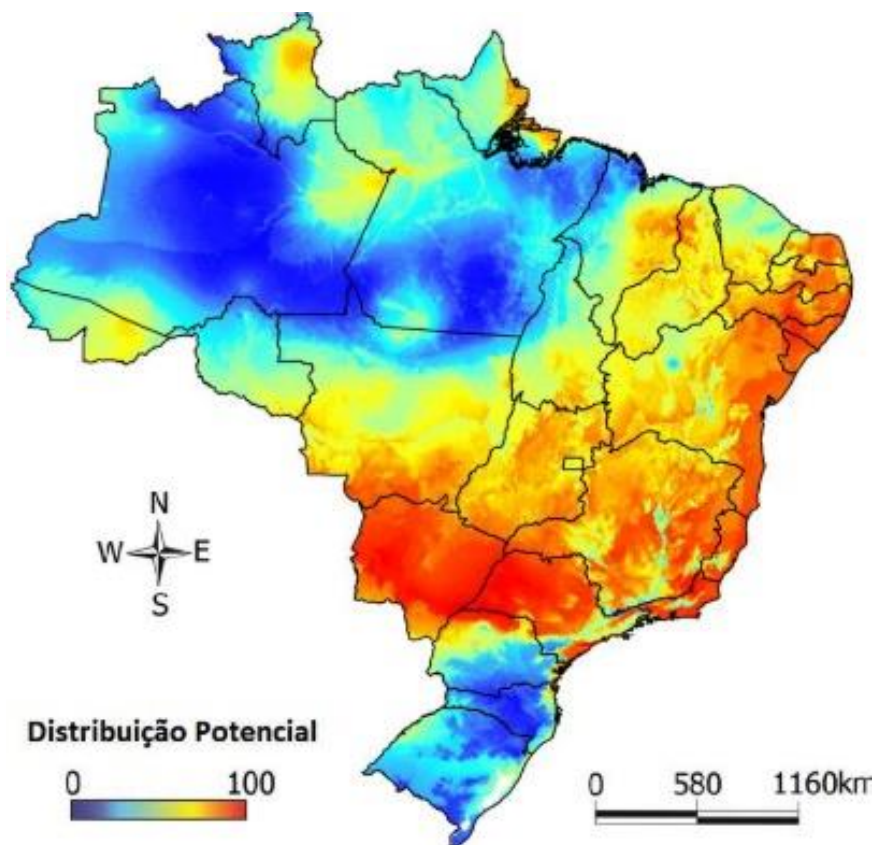


Figura 1.4 - Mapa de distribuição das áreas prováveis de ocorrência *L. longipalpis* no Brasil. Fonte: (Lorenz et al. 2019)

1.2. Flebotomíneos

Flebotomíneos são dípteros hematófagos da Família *Psychodidae* e Subfamília *Phlebotominae*. São insetos pequenos (2 a 3 mm), pilosos, asas em formato de “v” durante o repouso, patas longas e delgadas e vôo curto, semelhante a saltos (Brazil & Brazil, 2018). Esses insetos são também conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (Brazil & Brazil, 2018; Lainson & Rangel, 2003; OPAS, 2019). A Figura 1.5 mostra flebotomíneos adultos (macho e fêmea) da espécie *Lutzomyia longipalpis*.



Figura 1.5: Fêmea (esquerda) e macho (direita) de *Lutzomyia longipalpis*.

Foto: Josué Damacena/IOC/Fiocruz

([http://www.fiocruz.br/ioc/cqi/cgilua.exe/sys/start\(...\)?t=flebotom%EDneos](http://www.fiocruz.br/ioc/cqi/cgilua.exe/sys/start(...)?t=flebotom%EDneos))

Além de vetores de *Leishmania* spp., flebotomíneos também são capazes de transmitir vírus e bactérias do gênero *Bartonella* através da picada das fêmeas infectadas (Costa & Souza 2018; OPAS, 2019; Ready, 2013; Telleria et al., 2018).

Os vírus transmitidos por flebotomíneos são capazes de causar febre, encefalite, meningite e febre hemorrágica em humanos (Maroli, et al., 2013; Telleria et al., 2018). Essas arboviroses estão presentes na Europa, Ásia, África e Oriente Médio, sendo os

vírus mais conhecidos os do gênero *Phlebovirus* como o vírus da febre de Nápoles de flebotomíneos (incluindo o Vírus de Nápoles, o vírus Teerã, o vírus Karimabad e o Toscana vírus) e vírus de Salehabad (incluindo vírus de Salehabad e Arbia) (Berenger & Parola, 2017; Maroli et al., 2013). Há também registros de outros isolados (vírus da febre siciliana e vírus Corfou) possivelmente pertencentes ao gênero *Phlebovirus*, tendo como vetores envolvidos nessa transmissão *Phlebotomus Papatasi*, *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*, por exemplo (Maroli et al., 2013).

Com relação a bartonelose, as espécies *Lutzomyia (Helcocyrtomyia) peruensis*, *Pintomyia (Pifanomyia) columbiana* e *Pi. (Pif.) verrucarum* (Galati, 2003; Marcondes, 2007; Costa & Souza, 2018; Ready, 2013; Telleria et al., 2018) atuam como potenciais vetores da bactéria *Bartonella bacilliformis*, causadora da doença de Carrion também chamada de febre de Oroya ou 'verruca peruana'. Esta doença, na fase aguda, provoca sintomas como dores musculares e articulares, febre, delírio de cefaleia e até mesmo a morte de pacientes sem o devido tratamento. É uma doença originalmente identificada nos vales interandinos do Peru, Equador e Colômbia (Costa & Souza, 2018; Maroli et al., 2013; Ready, 2013; Telleria et al., 2018).

Esses dípteros estão amplamente distribuídos no mundo, especialmente em regiões tropicais e sub-tropicais, sendo conhecidas mais de 500 espécies só nas Américas, das quais 98 são espécies vetorais já incriminadas como vetores de *Leishmania* (Costa & Souza, 2018; Killick-Kendrick, 1999).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos (metamorfose completa) e apresentam 4 estágios de desenvolvimento em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adultos, conforme ilustrado na figura 1.6. As formas imaturas, detritívoras, normalmente estão em locais ricos em matéria orgânica em decomposição. Os adultos, machos e fêmeas, alimentam-se de açúcares de origem vegetal como fonte de carboidratos (Brazil & Brazil, 2018; Costa & Souza, 2018; Killick-Kendrick, 1999).

São insetos sensíveis a grandes variações de temperatura e umidade. Sendo assim, encontram-se em locais sombreados e úmidos como ocos de árvores, copa de árvores, grutas ou abrigos de animais como tocas de roedores, chiqueiros e galinheiros (Brazil & Brazil, 2018; Costa & Souza, 2018; Killick-Kendrick, 1999).

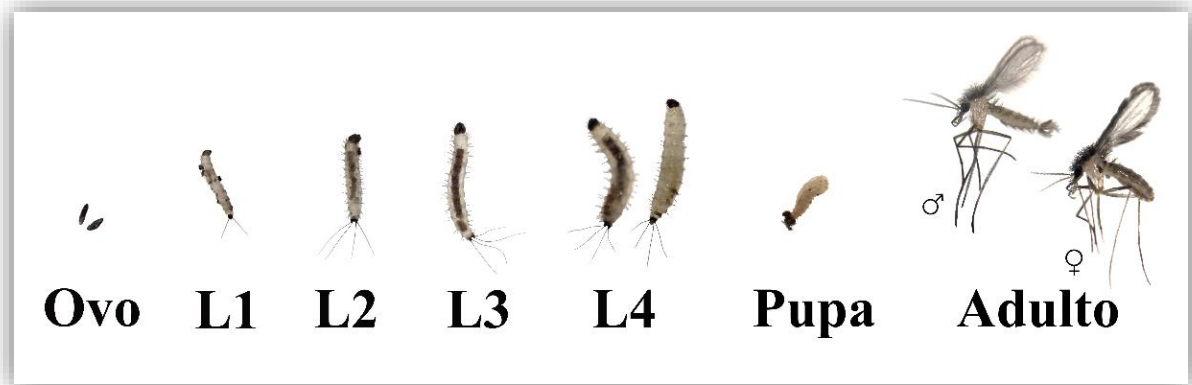


Figura 1.6 - Ciclo de vida de flebotomíneos (*L. longipalpis*).

Fonte: Do Valle, 2020; <https://educare.fiocruz.br/resource/show?id=6wvYesS6>

As fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para obter os nutrientes necessários para maturação e postura dos ovos (Brazil & Brazil, 2018; Costa & Souza, 2018). Nesse sentido, as fêmeas se alimentam de sangue de cães, gatos e humanos no ambiente urbano, ou de raposas, marsupiais e roedores, no ambiente silvestre, o que os torna potenciais fontes de infecção e reservatórios de *Leishmania* (Brasil, 2014; Lainson & Rangel, 2003).

Os adultos possuem hábitos crepusculares e noturnos, podendo variar seu micro-habitat, mas procurando manter-se em locais úmidos, com pouca luz e movimentação de ar, e temperatura ambiente amena, na busca de hospedeiros vertebrados ou da cópula (Lainson & Rangel, 2003; Brazil & Brazil, 2018).

Para que a cópula aconteça é necessário haver estímulos visuais, olfativos e auditivos entre machos e fêmeas da mesma espécie. Sabe-se que machos de *L. longipalpis* fazem a corte através de movimentos circulares consecutivos e dos batimentos de asas para atrair as fêmeas (Souza et al., 2004; Vigoder et al., 2010). Ao aceitar o chamado, as fêmeas respondem batendo suas asas com movimentos vibratórios

específicos e com a aproximação de seus apêndices genitais (Brazil & Brazil, 2018; Soares & Turco, 2003; Souza et al., 2004; Vigoder et al., 2010; Vigoder et al., 2020).

Além disso, os machos liberam feromônios sexuais para atrair o sexo oposto. Esses feromônios, muitos de origem terpênica, são específicos para as diferentes populações de *L. longipalpis* (Brazil & Brazil, 2018; Hamilton, Brazil, & Maingon, 2004; Peixoto, 2013; Vigoder et al., 2015, 2020). Dessa forma, *L. longipalpis* é considerado um complexo de espécies, o que foi inicialmente evidenciado por Mangabeira Filho (1969) estudando flebotômíneos brasileiros (De Souza, Brazil, & Araki, 2017).

Após a cópula, as fêmeas de flebotômíneo procuram locais úmidos e ricos em matéria orgânica, que garanta a alimentação e desenvolvimento das larvas. Os ovos medem de 0,3-0,5 mm de comprimento por 0,07-0,15 mm de largura com formato oval ou elipsóide, sendo inicialmente esbranquiçados e após algumas horas tornam-se castanho escuros (Figura 1.7) (Lainson & Rangel, 2003; Brazil & Brazil, 2018).



Figura 1.7 - Ovos e larvas recém eclodidas de *L. longipalpis*. Fonte: arquivo pessoal

Em condições de laboratório, uma fêmea de flebotômíneo pode colocar cerca de 40 ovos, em média, variando de acordo com a espécie e condições ambientais (Brazil & Brazil, 2018; Brazil et al., 1997; Lainson & Rangel, 2003 e observações pessoais). Os

ovos são revestidos por uma substância rica em ácidos graxos que confere impermeabilidade e rigidez (Brazil et al., 1997; Brazil & Brazil, 2018).

Após a eclosão, as larvas se alimentam rapidamente da matéria orgânica que estiver ao seu alcance como cascas dos ovos e corpos de adultos mortos. Várias dietas já foram estabelecidas experimentalmente, mas a que vem sendo utilizada há muitos anos com sucesso na criação de *L. longipalpis* do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI – IOC/FIOCRUZ) e em outros laboratórios ao redor do mundo, é uma mistura de igual proporção de fezes de coelho, ração de roedores e terra adubada (Brazil & Brazil, 2018; Lawyer, et al., 2017; Vale et al., 2012).

As larvas apresentam uma coloração de esbranquiçada a amarelada e seu tamanho varia conforme sua fase de desenvolvimento (estádios L1 a L4), medindo aproximadamente 0,5 mm a 3 mm. Apresentam corpo segmentado, dividido entre cabeça (coloração escura), tórax (2 segmentos) e abdômen (9 segmentos), contendo cerdas semelhantes a espinhos. Possuem também cerdas caudais. As larvas L1 (primeiro estágio) apresentam um par de cerdas caudais e os demais (L2 a L4) possuem dois pares, mais especificamente para o gênero *Lutzomyia* (figuras 1.2 e 1.3) (Brazil & Brazil, 2018; Killick-Kendrick, 1999; Lainson & Rangel, 2003; e observações pessoais).

Ao chegar ao estágio L4 a larva passa a comer menos até esvaziar todo seu conteúdo intestinal, deixando-a com uma coloração esbranquiçada, dando seguimento à transformação em pupa. Essa fase é mais resistente que os ovos e larvas às variações de umidade. As pupas têm 2,5 mm de comprimento, coloração amarelada e permanecem imóveis e fixas sobre alguma superfície pela extremidade posterior, por meio do exúvio larval, realizando apenas movimentos de flexão e extensão do corpo, sem se alimentar e fazendo apenas respiração aérea (ver figura 1.2) (Brazil et al., 1997; Brazil & Brazil 2018; Soares & Turco, 2003).

Após a emergência, os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual observado pela morfologia, principalmente nas peças bucais e genitais (Figura 1.1 e 1.2), assim como nos hábitos alimentares. As fêmeas são hematófagas e consideradas ecléticas, podendo obter sangue de diferentes espécies de animais

vertebrados, inclusive de humanos (Brazil & Brazil, 2018; Killick-Kendrick, 1999; Lainson & Rangel, 2003).

Os adultos recém emergidos são pouco ativos. Os machos precisam de até 24 horas para que ocorra uma rotação de 180° e dobramento de seus apêndices genitais, permitindo a cópula com as fêmeas (Brazil & Brazil, 2018; Lainson & Rangel, 2003).

Machos e fêmeas alimentam-se de açúcares de origem vegetal, especialmente glicose, frutose e sacarose. Esses açúcares estão presentes, por exemplo, no néctar e nas secreções de afídeos, e são usados como fonte de energia para o voo (Anez et al., 1994; Brazil & Brazil, 2018; Ready, 2013; Soares & Turco, 2003; Takken & Koenraadt, 2013). Fêmeas de *L. longipalpis*, em condições de laboratório, conseguem ingerir volumes médios de 20 nL de solução açucarada (Ferreira et al., 2018), que ficam estocados em seus divertículos (órgão de estocagem de açúcar em dípteros), sendo metabolizados lentamente ao longo dos dias (Brazil et al., 1997; Brazil & Brazil, 2018; Takken & Koenraadt, 2013).

Estudos mostram que a dieta açucarada parece ter influência também sobre os parasitos, auxiliando seu desenvolvimento e migração para porção anterior do intestino do inseto por ação quimiotática e possivelmente servindo como fonte de energia (Bates, 2008; da Costa et al., 2019; Oliveira, et al., 2000; Rêgo & Soares, 2021). Após a alimentação sanguínea, as fêmeas precisariam de açúcar como fonte de energia suplementar, e junto com a saliva, promovem a orientação das promastigotas devido a ativação de receptores encontrados na superfície da membrana dos parasitos (Bates, 2008; Oliveira et al., 2000).

Diferente dos mosquitos, flebotomíneos apresentam peças bucais curtas. Então, para atingir e romper vasos sanguíneos, precisam dilacerar ou cortar a pele, já que penetram somente até 0,5 mm na pele do hospedeiro. É através da telmatofagia (ou *pool-feeding*) que as fêmeas causam uma micro hemorragia subcutânea, formando uma pequena poça de sangue durante a picada. Estima-se que consigam ingerir de 0,1 a 0,6 mg de sangue por repasto (Araújo et al., 2012; Brazil & Brazil, 2018; Brazil, et al., 1997; Francischetti, 2011; Tanaka et al., 2012).

As fêmeas precisam realizar um repasto sanguíneo para desenvolvimento ovariano e produção de ovos. Em geral, a quantidade de ovos é proporcional ao volume de sangue ingerido, ou seja, apresentam concordância gonotrófica (Brazil & Brazil, 2018; Lehane, 2005). No entanto, é comum algumas espécies de flebotomíneos, como *L. longipalpis* e *N. whitmani*, realizarem um segundo repasto antes da postura dos ovos, para manutenção do equilíbrio hídrico (Brazil & Brazil, 2018; Moraes et al., 2018; Rêgo & Soares, 2021; R. P. P. Soares & Turco, 2003).

Quanto à preferência por hospedeiros, flebotomíneos de regiões neotropicais são considerados ecléticos e procuram animais de sangue quente, alimentando-se em humanos, cães, aves, entre outros (Brazil & Brazil, 2018; Lainson & Rangel, 2003). A busca por hospedeiros se dá por estímulos térmicos e olfativos, identificados por células nervosas ligadas às antenas e cerdas próximas ao aparato bucal (Brazil & Brazil, 2018; Guidobaldi, May-Concha, & Guerenstein, 2014).

Estima-se que flebotomíneos adultos vivam cerca de 20-30 dias na natureza, a depender das oscilações de temperatura e umidade (Brazil & Brazil, 2018). Observações pessoais nossas durante a criação de *L. longipalpis* mostram que, mesmo com uso de incubadoras de temperatura controlada, a longevidade pode ser afetada, assim como oviposição, desenvolvimento larval e taxa de emergência, em função baixa umidade (<< 55%) e temperaturas ocasionalmente fora da faixa de $26 \pm 2^\circ \text{C}$.

Sabe-se que a sobrevivência de fêmeas que se alimentam de açúcar e sangue é maior do que aquelas que se alimentam só de sangue (Abdel-Hamid, 2012; Killick-Kendrick, 1999; Moraes et al., 2018). Aspectos reprodutivos de fêmeas também parecem ser influenciados pela dieta açucarada. Entretanto, ainda não é claro o peso dos aspectos relacionados a essa dieta na capacidade vetorial (Takken & Koenraadt, 2013).

Outro fato de relevância no ciclo de transmissão é que, além de *L. longipalpis* ser vetor específico de *L. infantum*, também é um vetor permissivo, podendo ser assim infectado em laboratório por outras espécies de *Leishmania* como *L. amazonensis* e *L. mexicana* (Cristina et al., 2021; da Costa et al., 2019; Dostálová & Volf, 2012;

Ferreira et al., 2018; Ready, 2013). Isso adiciona uma preocupação a mais no controle dessa espécie, já que na ausência ou limitação de vetores espécie-específicos, *L. longipalpis* poderia atuar como vetor secundário no ciclo de LC ou LMC.

1.3. Agente Etiológico e desenvolvimento no vetor

O gênero *Leishmania* é formado por protozoários da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae* (Brasil, 2017; OPAS, 2019; OMS, 2022). Esses parasitos possuem um ciclo de vida heteroxênico ou digenético, ou seja, apresentam diferentes ciclos de vida em cada hospedeiro com diferentes formas morfológicas, denominadas amastigotas ou promastigotas. A forma amastigota é intracelular obrigatória, não flagelada, arredondada, com tamanho entre 3-5 μm e se desenvolve no hospedeiro mamífero suscetível. As formas promastigotas extracelulares alongadas e flageladas medindo entre 15-20 μm são encontradas no inseto vetor, conforme ilustrado na Figura 1.8. As duas formas fazem divisão binária e possuem uma única mitocôndria modificada conhecida como Kinetoplasto (Brasil, 2017; OPAS, 2019; OMS, 2022; Soares & Turco, 2003).

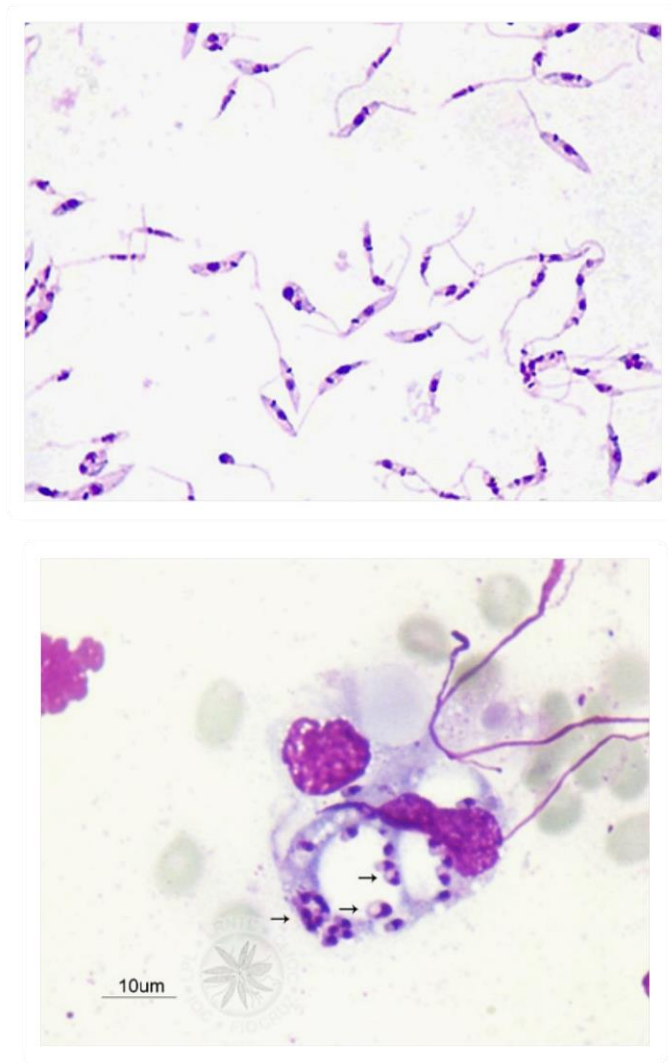


Figura 1.8: Forma promastigota (acima) e amastigota (abaixo) de *Leishmania*. Fonte: CLIOC/FIOCRUZ

Atualmente, são conhecidas cerca de 22 espécies do gênero *Leishmania* patogênicas para humanos, especialmente as pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Brasil, 2017; OPAS, 2019; OMS,2022).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são categorizados entre os subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Essa classificação foi feita por Lainson e Shaw (1979), e varia conforme o desenvolvimento e colonização das diferentes porções intestinais do flebotomíneo (Bates, 2007; OPAS, 2019; Pimenta et al., 2018).

As espécies de comportamento **hipopilárico** são aquelas que se alojam na região posterior do intestino do inseto e comumente infectam répteis. Previamente foram classificadas com um subgênero de *Leishmania*, mas atualmente são conhecidas como *Sauroleishmania*. Os parasitos de comportamento **peripilárico** pertencem ao subgênero *Viannia*. Parasitos desse subgênero estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e intestino posterior do flebotomíneo, migrando posteriormente para as porções mais anteriores ao longo do seu desenvolvimento. Espécies desse subgênero são encontradas apenas no Novo Mundo. Já espécies com comportamento **suprapilárico** apresentam desenvolvimento restrito ao intestino médio do flebotomíneo, ou seja, região anterior ao piloro (regiões abdominais e torácicas do intestino médio). Estas espécies de *Leishmania* pertencem ao subgênero *Leishmania* e estão distribuídas no Novo Mundo e no Velho Mundo. Os parasitos com comportamento peripilárico e suprapilárico têm sido associados às infecções em mamíferos (Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012; Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018; Sacks, 2001). Na figura 1.9 é possível identificar as regiões mencionadas do intestino do flebotomíneo.

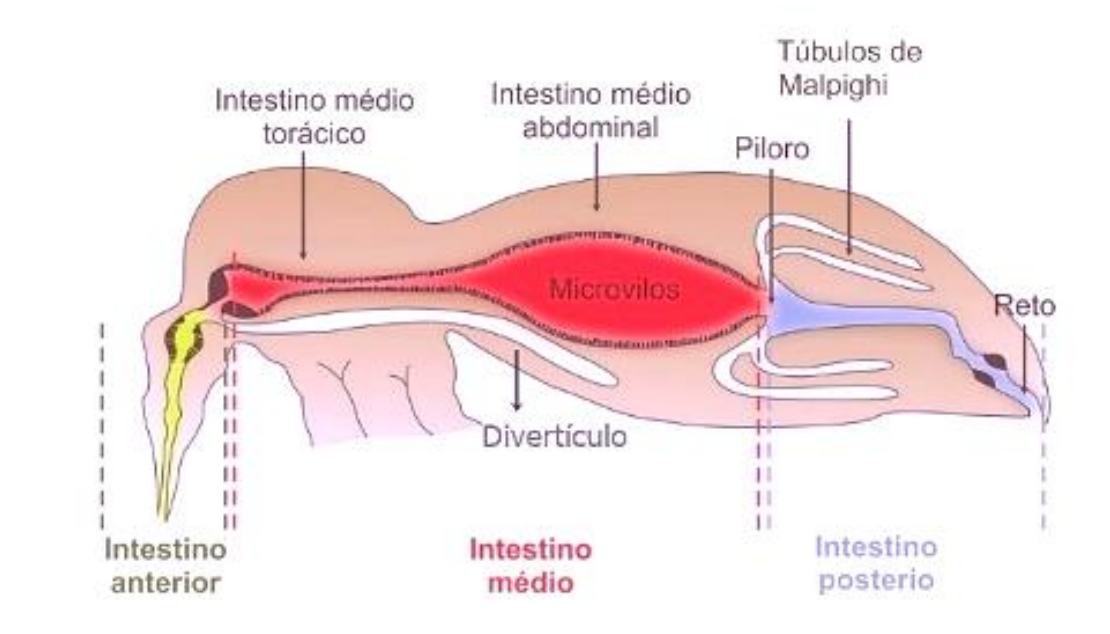


Figura 1.9: Modelo de intestino de um flebotomíneo.
Imagem adaptada de (Pimenta, Freitas & Secundino, 2012).

A infecção do inseto ocorre quando as fêmeas se alimentam de sangue de mamíferos contaminados, ingerindo macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No intestino do vetor acontece o rompimento desses macrófagos e a liberação dessas formas. A partir daí os parasitos reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente como promastigotas, as formas flageladas, colonizando as regiões do intestino médio do vetor. A primeira forma flagelada é chamada procíclica e tem grande habilidade multiplicativa, que ocorre por divisão celular binária (Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012; Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018). Com o avanço da digestão sanguínea pelo flebotomíneo, os parasitos minimizam a replicação e se diferenciam em uma nova forma conhecida como nectomonas, que possui um formato mais alongado e flagelo maior comparado com a forma procíclica. As nectomonas se acumulam na extremidade anterior da matriz peritrófica e conseguem escapar do bolo alimentar através da ação de quitinases. Isso ocorre entre o 2º e 4º dia após a ingestão do sangue, com a migração para a região anterior do intestino médio, onde as nectomonas ficam aderidas às microvilosidades do epitélio intestinal através de seus flagelos. Em muitas espécies de *Leishmania*, essa adesão se dá pela presença de moléculas conjugadas do tipo lipofosfoglicanos (LPG) (Bates, 2007; Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018). Esse fosfoglicano parece ser determinante em relações parasito-vetor espécie-específicas, como *P. papatasi* e *L. major*, já que essa adesão é controlada pela galectina do inseto que atua como receptor do LPG encontrado na superfície da *Leishmania*. No entanto, em espécies permissivas de vetores, como *L. longipapis*, a ausência do LPG não parece prejudicar o desenvolvimento de espécies não específicas do parasito (Bates, 2007; Pimenta et al., 2018). Na porção anterior do intestino, por volta do 4º e 5º dia, podemos encontrar outras formas promastigotas: as leptomonas (nectomonas curtas com capacidade replicativa) e paramastigotas (formato arredondado) (Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012; Sacks, 2001). Parte das promastigotas nectomonas e leptomonas podem se ligar à superfície que envolve a válvula e se diferenciam em promastigotas haptomonas (formas mais curtas e amplas) (Bates, 2007; Pimenta et al., 2018; Sacks, 2001). Nesse momento há também a produção do gel secretado por promastigotas leptomonas (promastigote secretory gel – PSG), gerando o bloqueio

dessa válvula e forçando o flebotomíneo a regurgitar e liberar os parasitos durante a próxima picada. O PSG é constituído de proteofosfoglicanos (PPGs) filamentosos que formam uma rede tridimensional e gelatinosa, que bloqueia parte da região anterior do trato digestivo de flebotomíneos infectados. Essa obstrução prejudica a alimentação sanguínea, já que força a fêmea a regurgitar o PSG antes que ela complete seu repasto, depositando assim tanto o PSG quanto as formas infectivas na pele do hospedeiro mamífero (Bates, 2007). Além disso, estudos observaram que a válvula do estomodeu tem sua cutícula, composta por quitina, danificada pela liberação de quitinases secretadas pelos parasitos, favorecendo sua regurgitação do intestino médio por meio da ação das bombas faríngea e cibarial durante a alimentação sanguínea (Bates, 2007; Rogers et al., 2008; Schlein, Jacobson, & Messer, 1992). Por fim, a *Leishmania* muda para a forma infectiva, as promastigotas metacíclicas, que são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado em uma segunda alimentação sanguínea (Pimenta et al., 2018; Sacks et al., 2000). Vale mencionar que os parasitos ainda alteram o comportamento alimentar das fêmeas, visto que quanto maior quantidade de promastigotas metacíclicas, maiores são as chances dessas fêmeas buscarem hospedeiros mamíferos para realizar sua segunda alimentação sanguínea. Tudo isso aumenta as tentativas sucessivas de picadas e disseminação dos patógenos na pele do hospedeiro devido (Rogers & Bates, 2007; Pimenta et al., 2018; Sacks, 2001) (Figura 1.10 e 1.11 - parte 1).

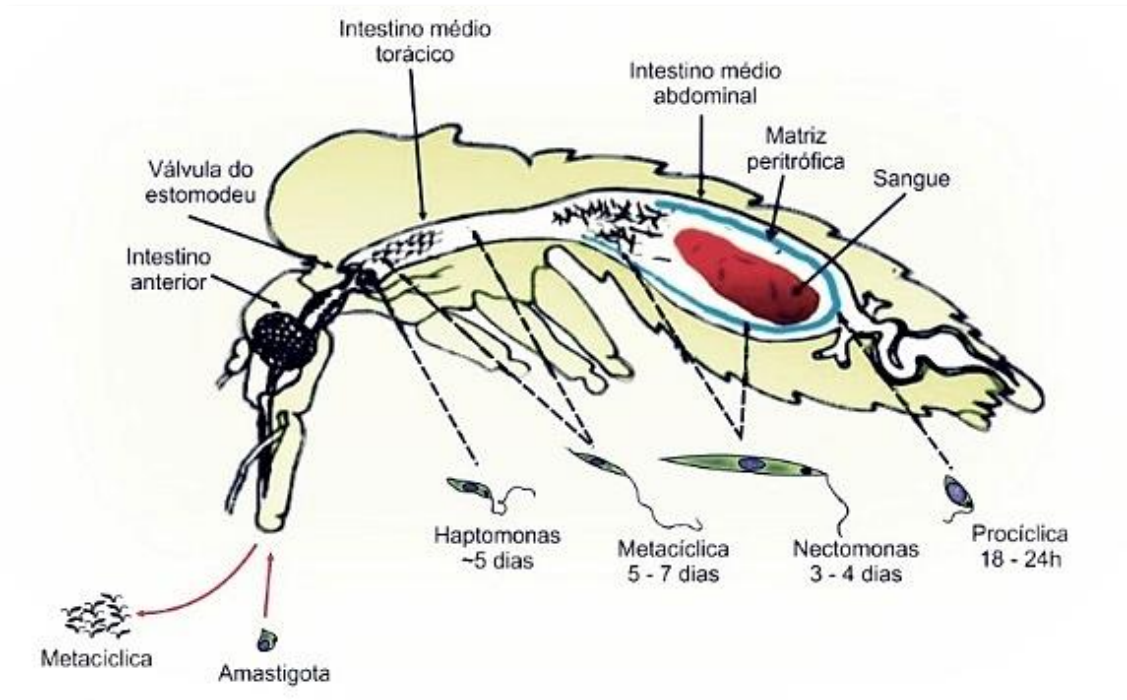


Figura 1.10: Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* sp. Imagem adaptada de Pimenta et al., 2012.

Entretanto, os achados de Serafim e colaboradores (2018) identificaram mudanças nesse ciclo que garantem a maior eficiência na disseminação dos parasitos. Os autores verificaram que parte das promastigotas metacíclicas que não são transmitidas durante a picada (em uma segunda alimentação) permanecem na porção anterior do intestino do flebotomíneo e se “dediferenciam” em promastigostas retroleptomonas, à espera de outros repastos sanguíneos para se converterem em formas metacíclicas, tudo isso acompanhado de crescimento populacional através de replicação. Além disso, há também aumento das formas promastigostas haptomonas, que ficam ancoradas na superfície do intestino médio anterior, próximo à válvula do estomodeu (Figura 1.10). Nesse momento, há um aumento expressivo na produção do PSG, otimizando o bloqueio dessa válvula e forçando o flebotomíneo a regurgitar e liberar mais parasitos durante a picada (Figura 1.11 – parte 2 pontilhada) (Bates, 2018; Serafim et al., 2018).

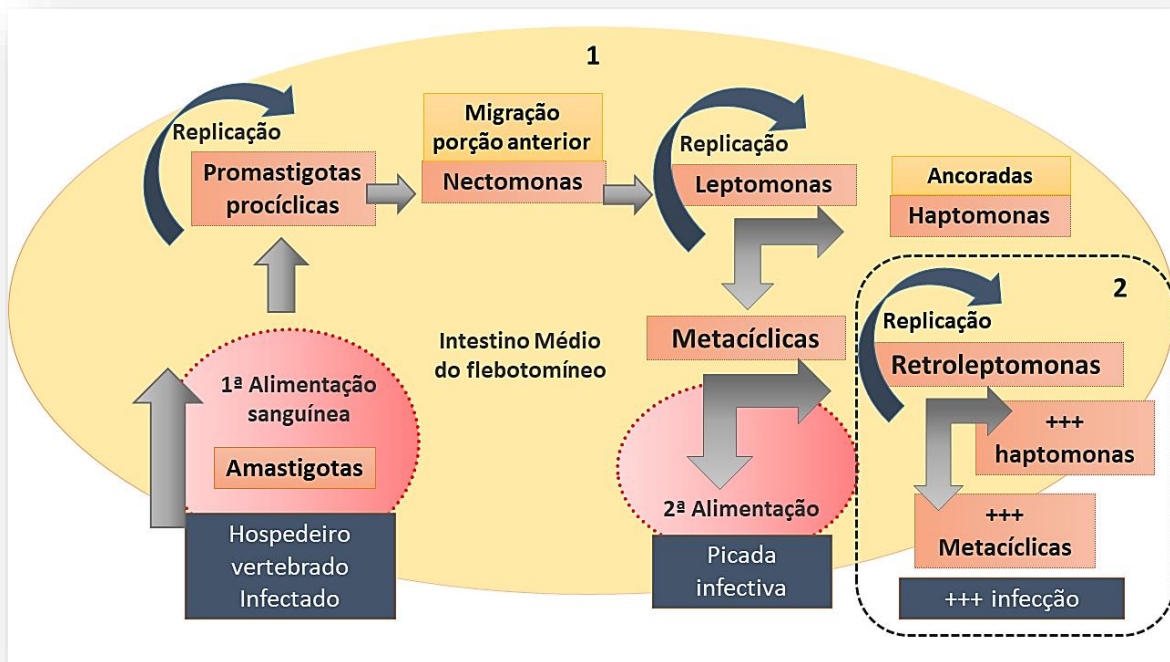


Figura 1.11: Esquema do antigo versus novo ciclo de *L.infantum* no intestino de flebotomíneos. O número “1” representa o ciclo já conhecido e a caixa com número “2” representa as contribuições de Serafim et al., 2018. Fonte: arquivo pessoal, adaptada de (Bates, 2018)

Os parasitos precisam superar diferentes barreiras no seu desenvolvimento dentro do vetor, então desenvolveram diferentes habilidades para manipular aspectos fisiológicos e imunológicos do inseto (Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018). A primeira delas é a suscetibilidade das formas amastigotas presentes no sangue do hospedeiro às condições físico-químicas do intestino do inseto. Como resposta, os parasitos logo se adaptam à mudança de temperatura e elevação do pH ao passar para o intestino médio do flebotomíneo, disparando sua modificação em promastigotas procíclicas (Bates, 2007; Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018; Sacks et al., 2000). As próximas barreiras são lidar com a atividade das enzimas digestivas (como tripsina, quimiotripsina, aminopeptidases, carboxipeptidases e glicosidades), sendo cercados pela matriz peritrófica (MP) do inseto (Pimenta et al., 2018; Van Bockstal et al., 2020). A matriz peritrófica é formada por microfilamentos de quitina

associados a proteínas e proteoglicanas, e tem como principais funções a compartimentalização do sangue, permeabilização de enzimas digestivas e proteção do epitélio do intestino médio contra patógenos ingeridos (Lehane, 1997; Secundino, et al., 2005). Os parasitos, então, contrapõem as atividades enzimáticas intestinais pela secreção de fosfoglicanos de superfície, que os protegem de danos proteolíticos e ainda permitem a sua replicação (Pimenta et al., 2018; Sacks et al., 2000). Além disso, alguns estudos já descreveram que esses protozoários podem modular atividades enzimáticas intestinais (Schlein & Romano, 1986; Borovsky & Schlein, 1987 revisados por Kamhawi 2006; Sacks & Kamhawi, 2001). Em seguida, para não serem eliminados junto com as fezes do flebotomíneo, precisam escapar da MP, o que é mediado por quitinases secretadas pelos próprios parasitos, mas também se favorecendo da própria quitinase intestinal do inseto (Bates, 2007; Pimenta et al., 2018). Depois de finalizada a digestão do sangue, os parasitos migram para a região próxima à válvula estomodeal, seguindo-se a diferenciação em formas metacíclicas, que são a forma infectante capaz de ser injetada e infectar o hospedeiro vertebrado no momento da picada (Kamhawi, 2006; Pimenta et al., 2018; Van Bockstal et al., 2020).

Para sobreviver ao processo digestório do inseto, vemos que os parasitos precisam passar por diferentes estágios de promastigotas, enquanto migram para diferentes porções do intestino. Sabe-se que *Leishmania* sofre amplificação clonal assexuada, mas durante esse processo pode haver troca genética, resultando na geração de híbridos. É possível que esses híbridos sofram modificações que resultarão em maior aptidão de sua progênie, permitindo, por exemplo, a obtenção de características combinadas (resistência) (Van Bockstal et al., 2020).

Durante a picada os parasitos são regurgitados junto com a saliva e o PSG dos flebotomíneos. A salival contém diversos componentes com atividade hemostática no hospedeiro vertebrado, tais como vasodilatadores, inibidores de agregação plaquetária, anti-coagulantes, imunossupressores, entre outros. Já o PSG é um importante fator de virulência do parasito que, combinado com a saliva do inseto, aumentam significativamente as infecções quando entregue na pele do hospedeiro e

umentam a quantidade de formas metacíclicas liberadas (Bates, 2007; Pimenta et al. 2018; Soares and Turco 2003; Rogers et al., 2004).

Os componentes salivares têm grande importância na transmissão dos patógenos por insetos vetores. Estudos de componentes da saliva de *L. longipalpis* já mostraram sua capacidade em aumentar o tamanho de lesões em camundongos ou humanos, além de modular citocinas e estimular o recrutamento de macrófagos para o local da picada (De Souza et al., 2017; Sacks, 2001; Soares et al., 1998; Warburg et al., 1994). Esses efeitos são atribuídos principalmente às apirases e ao maxadilan. Apirase é uma enzima com atividade inibidora de agregação plaquetária, encontrada em ambos os gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Já o maxadilan é um peptídeo de 63 aminoácidos com grande capacidade de modulação da resposta imune, presente na saliva de *L. longipalpis* (Pimenta et al., 2018; Soares & Turco, 2003).

No hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas do parasito, que são regurgitadas pelo inseto durante a picada, são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. Dentro dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento da célula. Assim, ocorre a liberação dessas formas, que vão se disseminar para outros tecidos (Pimenta et al., 2018; Soares & Turco, 2003).

1.4. Compostos anti-*Leishmania*

No Brasil, desde a década de 40 os derivados de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) e suas formulações (Stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina) vêm sendo a primeira escolha de fármacos usados no tratamento das leishmanioses. Essas drogas têm como mecanismo a inibição da atividade glicolítica e da via oxidativa de ácidos graxos das formas amastigotas (Brasil, 2014, 2017; OPAS, 2019).

No entanto, os antimoniais apresentam importantes efeitos colaterais, que precisam ser considerados na escolha terapêutica. O antimoniato-N-metil glucamina exibe efeitos adversos decorrentes de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. O paciente pode apresentar também anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal,

insônia, nervosismo, edema, aumento da diurese devido à ausência da habilidade de concentração urinária, insuficiência renal aguda (IRA), entre outros (Brasil 2014, 2017; OPAS, 2019). Assim sendo, são contraindicados para pessoas que utilizam betabloqueadores, drogas antiarrítmicas e gestantes, pois podem atravessar a barreira transplacentária e levar o feto a desenvolver síndromes severas de atraso mental (Brasil 2014, 2017; OPAS, 2019).

Como opção de tratamentos, recomenda-se o uso de anfotericina B e suas formulações (lipossomal e dispersão coloidal), pentamidinas (sulfato e mesilato), azitromicina, paromicina e miltefosina (Brasil 2014, 2017; Mansueto et al., 2014; OPAS 2019; Torres-Guerrero et al., 2018).

A anfotericina B é um poliênico com ação antifúngica e antibiótica isolado de *Streptomyces nodosus*, usada particularmente para o tratamento da LV, atuando nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, *in vitro* e *in vivo*. Seu mecanismo de ação ocorre pela ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática do parasito (Brasil, 2011, 2014; Tiwari et al., 2018). No entanto, a anfotericina B não é indicada para cardiopatas, hepatopatas e nefropatas (Brasil, 2014, 2017; OPAS, 2019).

A pentamidina é um anel aromático diamidínico com atividade antifúngica e anti-tripanosomatídeos (Pépin & Milord, 1994). Apresenta efeitos adversos como: dor, náuseas, vômitos, tontura, cefaléia, hipotensão, hipo/hiperglicemia, entre outros (Brasil 2014, 2017; OPAS, 2019). É contraindicada para gestantes, diabéticos, pacientes com insuficiência renal ou hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8 kg (Brasil 2014, 2017; Mansueto et al, 2014).

Além das questões relacionadas à escolha terapêutica, tem sido crescente o número das linhagens de *Leishmania* resistentes a essas drogas tradicionais, aumentando a necessidade de prospecção de novos fármacos (Andrade-Neto et al., 2018; Mansueto et al., 2014; Tiuman et al., 2011; Tiwari et al., 2018).

Nesse sentido, estudos com quimioterápicos alternativos vêm sendo publicados, especialmente aqueles com descrição de drogas de origem vegetal, ou sintéticas de estrutura análoga às naturais (Gervazoni et al., 2020; Marques et al., 2013; Tiuman et al., 2011; Tiwari et al., 2018). Esses compostos ainda apresentam a vantagem de serem mais amigáveis ao meio ambiente.

Fitoconstituintes das classes das lignanas, chalconas, flavonóides, saponinas, quinonas, alcalóides, taninos, terpenóides e oxilipinas e outros metabólitos secundários de plantas (MSPs) têm apresentadas atividades anti-*Leishmania* (Gervazoni et al., 2020; Sen & Chatterjee, 2011; Tiwari et al., 2018).

Por exemplo, as quinonas e seus derivados possuem atividade antimicrobiana, anti-tripanosomatídeos, antiviral e antitumoral devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de induzir a apoptose celular por inibição de topoisomerases (Sen & Chatterjee, 2011; M. N. da Silva, Ferreira, & Souza, 2003; Sousa, Lopes, & De Andrade, 2016). Já as pterocarpanas, pertencentes ao grupo dos isoflavonóides, são agentes defensivos das plantas contra infecções fúngicas e outros micro patógenos, radiação UV e altas concentrações de sais metálicos (Drijfhout & Morgan, 2010; Netto et al., 2010; Selvam, et al., 2017).

Buscando, então, otimizar esses efeitos anti-parasitários de fitoconstituintes, alguns grupos vêm desenvolvendo compostos sintéticos conhecidos como pterocarpanoquinonas, híbridos de quinonas e pterocarpanas (Buarque et al., 2011; Cunha-júnior et al., 2016; A. J. M. da Silva et al., 2009; Faiões et al., 2018; Luiz et al., 2015; Ribeiro et al., 2013; Vasconcelos et al., 2014) ou alterando a estrutura de compostos nitrogenados como hidroxietilamina e seus derivados (Cunico, Gomes, Facchinetti, et al., 2009; Quinn & Keough, 2002; Vasconcelos et al., 2014).

Essas drogas, sejam de origem natural ou sintética, mostram bons resultados anti-*Leishmania* em cultura ou no controle da infecção em modelo animal (Cunha-júnior et al., 2016; da Cunha-Júnior et al., 2011; Ribeiro et al., 2013), mas pouco se sabe sobre os possíveis efeitos dessas drogas na fisiologia do vetor ou sobre a estabilidade da atividade antiparasitária sobre as formas da *Leishmania* dentro do intestino do inseto.

Não podemos afirmar se efeitos anti-promastigotas causados por essas drogas em cultura persistem ou são otimizados dentro do intestino do inseto, por exemplo. Além disso, pensando em estratégias de controle vetorial, é necessário investigar se essas drogas afetariam também a fisiologia do inseto, pois se apresentarem efeitos deletérios ao inseto poderia influenciar também o desenvolvimento dos parasitos e a capacidade de disseminação dos patógenos pelo vetor.

1.4.1. Compostos anti-*Leishmania* e relação com flebotomíneos

Schlein e colaboradores vêm estudando aspectos da relação *Leishmania*-flebotomíneo e desenvolveram o conceito de iscas açucaradas atrativas (*attractive toxic sugar baits* - ATSBs), sabendo da importância da dieta açucarada para os flebotomíneos (Diarra et al., 2021; Junnila, Müller, & Schlein, 2011; Günter C. Müller et al., 2008; Günter C. Müller & Schlein, 2011; Qualls et al., 2015; Schlein, Y. and Jacobson, 1994). Nesses trabalhos, os autores avaliaram as fontes vegetais preferenciais de açúcar, prováveis abrigos de flebotomíneos, dentre outros fatores relacionados à biologia do vetor, testando diferentes tipos de ATSBs contendo compostos inseticidas para controle da alta densidade de *P. papatasi*.

No trabalho (Schlein & Jacobson, 1994) verificou-se que *P. papatasi* alimentados com determinadas espécies vegetais (*Ricinus communis*, *Capparis spinosa* e *Solanum luteum*) tiveram aumento na taxa de mortalidade e deformação dos parasitos após infecção. Em outras palavras, componentes vegetais demonstraram ação antiparasitária no inseto.

Unindo esses conceitos, iscas açucaradas e compostos com atividade antiparasitária sobre promastigotas, estaríamos diante de uma ATSB que atuasse no bloqueio ou redução do desenvolvimento da *Leishmania* ainda no vetor, afetando sua competência (o fator β da equação de capacidade vetorial) e sua capacidade vetorial (definições a seguir).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que metabolitos secundários (glicosídeos e seus aglicones) afetaram tanto a longevidade de *L. longipalpis* como também apresentaram efeitos anti-*Leishmania in vitro* e na infecção do flebotomíneo (Ferreira et al., 2018). Reforçando, assim, a necessidade de avaliar o efeito de drogas antiparasitárias não apenas na infecção, mas também nos aspectos fisiológicos do vetor.

1.5. Capacidade Vetorial

O controle do flebotomíneo vetor é uma das principais estratégias para redução do número de casos de leishmanioses, porém apresenta grande complexidade, já que as diferentes espécies de flebotomíneos exibem características próprias. O conhecimento de fatores como preferência alimentar, *habitats*, dispersão e comportamento é essencial para compreender a epidemiologia da doença e melhor delinear intervenções (Killick-Kendrick, 1999; Maia-elkhoury et al., 2018; OPAS, 2019). Um exemplo de limitação é a pouca informação sobre criadouros larvais, o que direciona as estratégias de controle para as formas adultas (Killick-Kendrick, 1999).

Nas leishmanioses, assim como em outras doenças de transmissão vetorial, os patógenos precisam de um tempo para se desenvolver e replicar dentro do inseto vetor. Esse período é chamado de período de incubação extrínseco (PIE) (Resh & Cardé, 2009).

Como descrito no item 1.3, parasitos do gênero *Leishmania* precisam de alguns dias para se desenvolver no intestino de flebotomíneos. Esse período pode variar de 4 a 17 dias, de acordo com a espécie do parasito e temperatura do ambiente (Munstermann, 2019).

Além disso, flebotomíneos precisam completar cerca de 8 dias de idade para poder realizar uma segunda alimentação sanguínea, dessa forma transmitindo as formas metacíclicas de *Leishmania* (Kamhawi, 2006). O PIE e a longevidade são aspectos considerados no modelo matemático que mensura a capacidade vetorial (Resh and Cardé, 2009).

A equação abaixo foi descrita para mosquitos por Ross (1911) e posteriormente adaptada por MacDonald (1957) e Smith e MacKenzie (2004), mas pode contemplar outros insetos vetores (Takken & Koenraadt, 2013).

$$C = \frac{\beta m \alpha^2 p^n}{-\ln p}$$

Sendo C a capacidade vetorial, β a competência vetorial (capacidade inerente de um vetor de transmitir determinado patógeno), m a densidade da população de vetores, α a taxa diária de picadas, n o período de incubação extrínseca do patógeno e p a sobrevivência diária. Sendo essa equação uma razão com alguns fatores exponenciais, qualquer alteração em uma das variáveis pode afetar muito a capacidade vetorial geral, e modificaria significativamente a dinâmica de transmissão da doença (Takken & Koenraadt, 2013). É válido mencionar que componentes fisiológicos, comportamentais e genéticos do vetor e do patógeno, assim como fatores ambientais (ex.: temperatura) também podem influenciar na capacidade geral (Takken & Koenraadt, 2013).

1.5.1. Técnicas para determinação de idade de flebotomíneos

Verificando os aspectos que compõem a capacidade vetorial, pode-se dizer que o conhecimento da longevidade do vetor, por exemplo, é uma informação fundamental para avaliar o impacto de estratégias de controle, seja com uso de inseticidas químicos ou com compostos de origem natural (Fraser et al., 2021; Lehane, 1985). De posse dessa informação, é possível preencher mais um dado da equação da previamente descrita, na qual o “ p ”, que corresponde à taxa de sobrevivência do vetor. Vale dizer que esse termo está no numerador e denominador dessa expressão, tendo um peso ainda maior na capacidade vetorial como um todo.

As metodologias clássicas de estimativa de idade em insetos são muito voltadas para análises de mudanças morfológicas, como avaliação de crescimento cuticular,

desenvolvimento de ovários (estado pré ou pós-oviposição) e quantificação de pteridinas (Detinova, 1962; Amendt, Bugelli, & Bernhardt, 2021; Lehane, 1985; Vogt & Walker, 1987). Técnicas que costumam ser laboriosas, demandam tempo e podem ser pouco precisas.

Uma alternativa para avaliar a longevidade de insetos é a análise de hidrocarbonetos cuticulares (HC), que requer etapas de extração, cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM) (Gibbs, 1995). Essa técnica se fundamenta na existência de padrões moleculares na composição de HC e dos diferentes modos vibracionais observados em espectros em diferentes espécies de insetos (Depickère, Ravelo-García, & Lardeux, 2020).

Mais recentemente, a determinação de idade de insetos, especialmente de mosquitos do gênero *Aedes* e *Anopheles*, mostrou resultados promissores usando a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) (Mayagaya et al., 2009; Reeves et al., 2010; Sikulu et al., 2010) ou através de técnicas moleculares baseadas na expressão de genes idade-dependentes (Caragata et al., 2011; P. E. Cook et al., 2006; Hugo et al., 2010).

Entretanto, para estimativa de idade de flebotomíneos, pouco se descreveu na literatura além das técnicas clássicas (Amendt et al., 2021; Lehane, 1985; Vogt & Walker, 1987), mostrando uma lacuna no conhecimento da biologia desse inseto vetor.

O uso da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS) tem sido uma alternativa viável com alta precisão, rapidez, eficiência e menor custo para estimar a idade de insetos de diferentes ordens (Aw et al., 2012; Lambert et al., 2018; Milali et al., 2019; Reeves et al., 2010; Sikulu et al., 2010).

Já a avaliação de expressão de genes idade-dependentes foi iniciada com estudos em *Drosophila melanogaster* (Cook et al., 2006), possibilitando a avaliação dessa técnica em outros insetos, incluindo vetores.

No presente estudo avaliamos como a adição de drogas antiparasitárias a dieta de flebotomíneos podem afetar a fisiologia e a infecção do vetor e trabalhamos também no desenvolvimento de marcadores de idade de flebotomíneos. Esses achados vão

ampliar o conhecimento da biologia do vetor e podem ser a base para elaboração de estratégias de controle vetorial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar diferentes parâmetros fisiológicos relacionados à capacidade vetorial de *Lutzomyia longipalpis*, estudando o efeito de compostos anti-*Leishmania* em iscas açucaradas e desenvolvendo metodologias para determinação de idade de flebotomíneos.

2.2. Objetivos Específicos

Testar o efeito de iscas açucaradas contendo compostos anti-*Leishmania* de referência ou sintéticos sobre a fisiologia de *L. longipalpis*.

- Avaliar possíveis efeitos atrativos ou repulsivos de compostos sobre adultos de *L. longipalpis*
- Verificar a influência dessas substâncias na ingestão e preferência alimentar de flebotomíneos quando adicionadas à dieta açucarada.
- Analisar as implicações dos compostos sobre a longevidade de flebotomíneos, alimentação sanguínea e oviposição de fêmeas.
- Testar a influência das substâncias mais promissoras sobre a infecção de *L. longipalpis* com *L. amazonensis*.

Desenvolver marcadores idade dependentes em flebotomíneos utilizando técnicas de biologia molecular e espectroscopia de infravermelho.

- Estudar o padrão de expressão em *L. longipalpis* de genes idade-dependentes já descritos em outros dípteros como *Aedes* e *Drosophila*;

- Desenvolver um modelo de estimativa de idade com uso de espectroscopia de infravermelho em adultos de *L. longipalpis*.
- Validação das metodologias de estimativa de idade (moleculares e infravermelho) em populações de laboratório submetidas a diferentes regimes de alimentação e condições fisiológicas.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

Esta tese é composta por quatro artigos científicos. O primeiro em formato de artigo já publicado, o segundo submetido, e o terceiro e o quarto em fase de fechamento de resultados e redação para publicação.

O artigo 1 (capítulo 1) traz os resultados de efeito dos compostos anti-*Leishmania*, em solução açucarada, quanto à atratividade/repulsão, ingestão e preferência alimentar de flebotomíneos. Nesse artigo são apresentados os resultados das dez drogas testadas, além do solvente.

O trabalho 2 (capítulo 2) apresenta os resultados de estimativa de idade de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* usando espectroscopia na região do infravermelho próximo. Além da idade, o artigo traz também a classificação de insetos copulados ou não, de fêmeas que passaram por seu primeiro ciclo gonotrófico, alimentadas com açúcar e sangue, ou alimentadas apenas com solução açucarada.

O trabalho 3 (capítulo 3) traz os resultados dos compostos anti-*Leishmania* que passaram para a segunda fase do estudo. Ou seja, aqueles que demonstraram resultados mais promissores no trabalho 1 e foram testados em ensaio de longevidade, efeito inibidor de alimentação sanguínea e oviposição e, por fim, em sua influência na infecção de *L. longipalpis* com *Leishmania spp.*

O trabalho 4 (capítulo 4) apresenta os dados de padronização e variação de expressão de genes marcadores de idade de *L. longipalpis*.

3.1. CAPÍTULO 1

Artigo Publicado

Effects of anti-*Leishmania* compounds in the behavior of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*

Tainá Neves Ferreira, Reginaldo Peçanha Brazil, Mary Ann McDowell, Edézio Ferreira Cunha-Júnior, Paulo Roberto Ribeiro Costa, Chaquip Daher Netto, Eduardo Caio Torres Santos, Fernando Ariel Genta

Effects of anti-*Leishmania* compounds in the behavior of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*

Tainá Neves Ferreira,^a Reginaldo Peçanha Brazil,^{b,c} Mary Ann McDowell,^d Edézio Ferreira Cunha-Júnior,^e Paulo Roberto Ribeiro Costa,^f Chaquip Daher Netto,^g Eduardo Caio Torres Santos^h and Fernando Ariel Genta^{a,c*}

Abstract

BACKGROUND: Leishmaniasis is an infectious parasitic disease caused by pathogens of the genus *Leishmania* transmitted through the bite of adult female sand flies. To reduce case numbers, it is necessary to combine different control approaches, especially those aimed at the sand fly vectors. Innovative forms of control with the use of attractive sugar baits explored the fact that adult sand flies need to feed on sugars of plant origin. *Leishmania* parasites develop in the gut of sand flies, interacting with the sugars in the diet of adults. Recent studies have shown that sugar baits containing plant-derived compounds can reduce sand fly survival, the number of parasites per gut, and the percentage of infected sand flies. Several synthetic compounds produced from naphthoquinones and pterocarpanes have anti-parasitic activity on *Leishmania amazonensis* and/or *Leishmania infantum* in cell culture. This work aimed to assess the inclusion of these compounds in sugar baits for blocking transmission, targeting the development of the *Leishmania* parasite inside the sand fly vector.

RESULTS: We evaluated the attractant or repellent properties of these compounds, as well as of the reference compound *N,N'*-diethyl-*m*-toluamide (DEET), in sugar baits. We also observed changes in feeding preference caused by these compounds, looking for anti-feeding or stimulation of ingestion. Pterocarpanquinone L4 and pentamidine showed attractant and repellent properties, respectively.

CONCLUSION: Based on the effects in feeding preference and intake volume, pterocarpanquinone L6, and the pyrazole-derived compound P8 were chosen as the most promising compounds for the future development of anti-*Leishmania* sugar baits.

© 2022 The Authors. *Pest Management Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

Keywords: sand fly; sugar bait; *Leishmania*; repellent; deterrent; *Lutzomyia*

* Correspondence to: FA Genta, Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: genta@ioc.fiocruz.br or E-mail: gentafernando@gmail.com

a Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

b Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, Brazil

d Eck Institute for Global Health, Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, IN, USA

e Laboratório de Imunoparasitologia, Unidade Integrada de Pesquisa em Produtos Bioativos e Biotecnologias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus UFRJ-Macaé, Macaé, Brazil

f Laboratório de Química Bioorgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

g Laboratório de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Brazil

h Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

© 2022 The Authors. *Pest Management Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

1 INTRODUCTION

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by *Leishmania* protozoans. These diseases are transmitted through the bite of hematophagous adult female sand flies, especially the genera *Lutzomyia* and *Phlebotomus*, which are endemic in more than 90 countries. Most of these countries have a low level of social-economic development.^{1–3} The disease manifests as three main types: cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis. Visceral leishmaniasis (VL), the most severe type of the disease, is mainly found in tropical and subtropical areas. In the Americas, VL is endemic in 12 countries and Brazil represents 96% of reported cases between 2001 and 2017.³ In the Americas, the main vector of *Leishmania infantum*, the causative agent of VL, is the sand fly species *Lutzomyia longipalpis*.⁴

Since it was developed in the 20th century, trivalent or pentavalent antimonials are used as the first-line treatment of leishmaniasis. Second-line anti-leishmanial drugs are amphotericin B and liposomal amphotericin B. Other medications such as pentamidine, azithromycin, and miltefosine are used in specific cases, such as infected young children and women during pregnancy.^{1,5–7}

Amphotericin B is a polyene anti-fungal and anti-biotic metabolite isolated from *Streptomyces nodosus*, and it is widely used as an alternative drug particularly for visceral leishmaniasis.^{8,9} Pentamidine (P9) has been used in the treatment of leishmaniasis for decades. It also has trypanocidal activity, being used for the treatment of Chagas disease, and has anti-fungal activity too. This drug structure presents an aromatic ring diamidine and it is soluble in water.^{10,11}

However, some of the medications used against Leishmaniasis (e.g. pentavalent antimonials) are difficult to administer and exhibit toxicity, which includes the common adverse effects of anorexia, nausea, vomiting, gastric fullness, abdominal pain, among others.^{5–7} Moreover, the record of parasite strains resistant to these traditional medications is growing, making the scenario even more worrisome.^{7,9,12}

Leishmania spp. have developed different mechanisms to deal with intracellular activation, accumulation, and target inhibition of antimonials. One of the main strategies of resistance occurs by limiting drug concentrations in the parasite, mainly by reducing absorption or increasing drug efflux/sequestration.¹³ Parasites have shown pentamidine resistance by reduced accumulation in

the mitochondria and also effluxes through an ABC transporter (pentamidine resistance protein 1 – PRP1).⁹ Species resistant to amphotericin B have an impediment to the drug's binding with ergosterol present in the parasite's membrane.⁹

Given these issues, there is a necessity for the development of new drug alternatives. In recent years, advances in chemotherapy have been made, mainly with the discovery of new compounds from plant extracts and the development of synthetic and semi-synthetic substances.^{9,12,14,15} Plants produce primary metabolites (PPMs) and also specialized metabolites (PSM). PPMs are essential for the central processes of growth and development such as carbohydrates, lipids, proteins, and chlorophyll.

PSMs, also called natural products, have functions that like to repel animals' herbivory and destructive pathogens, among many others. Other examples are to deter predators after contact and cause deleterious post-ingestive effects. They may also constitute defenses against abiotic stresses like extreme temperatures, water deficit, ultraviolet (UV) exposure, and mineral nutrient deficiency.^{16–20} PSMs responsible for herbivory containment show three basic strategies: compounds can be toxic, antidiagnostic, and antinutritive.¹⁷ In addition, some PSMs may be attractive for animal pollinators and seed dispersals. There is a huge diversity of PSMs, some examples are alkaloids, quinones, terpenoids, amines, cyanogenic glucosides, glucosinolates, non-protein amino acids, organic acids, phenolics, polyacetylenes, and peptides, that do not have an equal distribution among all plants.^{16–20}

The concept of the impact of plant compounds in the development of the *Leishmania* parasite in the sand fly vector was initially postulated by Schlein and Jacobson^{21,22} and the impact of plants in the biology of sand flies was explored in several works starting in the 1990s.^{23–26} Interestingly, several phytoconstituents and other specialized metabolites obtained from plants have been shown to have an effective anti-leishmanial activity including lignans, chalcones, flavonoids, saponins, quinones, alkaloids, tannins, terpenoids, and oxylipins.^{9,14,27,28}

Quinones are organic polycyclic aromatic compounds generally colored and semi-volatile. These substances have two carbonyl groups in positions 1,2 (ortho), or 1,4 (para), in one of their aromatic rings. The classification of these compounds as naphthoquinones, benzoquinones, phenanthraquinones, or anthraquinones depends on the presence of hydroxyl radicals (Fig. 1(A–C)) or the addition of new aromatic rings.^{18,30,31} In plants having

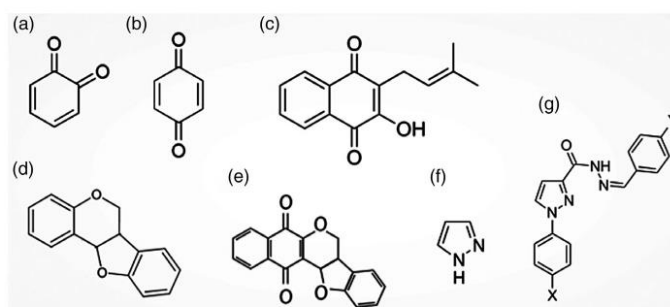


Figure 1. General structures of some plant specialized metabolites. *Tabebuia impetiginosa* specialized metabolites: 1,2-benzoquinone (A), 1,4-benzoquinone (B), and lapachol (C). Pterocarpan (D), pterocarpanquinone – compound L4 (E), pyrazole (F), and pyrazole derived compound (1,2-diazole and 1-(4-X-phenyl)-N-((4-Y-phenyl)methylene)-1H-pyrazole-4-carbohydrazides) (G). The figure was adapted from Küçükgülzel and Şenkardeş.²⁹

anti-oxidant properties, these molecules are a constituent of the electron-transport system, protecting cells from free-radical damage.^{18,31} Quinones present microbicidal, trypanosomicidal, virucidal, and anti-tumor properties induced by the production of reactive species from oxygen superoxide (O_2^-), hydroxyl (OH^\cdot), and hydrogen peroxide (H_2O_2). Furthermore, this compound can induce cellular apoptosis by inhibiting the topoisomerase complex.^{30,31} Another naphthoquinone, diospyrin (from *Diospyros montana* Roxb. (Ebenaceae)), also exhibits anti-leishmanial activity via free radical generation and inhibition of DNA topoisomerase I.²⁷

Flavonoids and their derivatives are mainly found in the Fabaceae family. Their general chemical structure has 15 carbon atoms containing two benzene rings connected with a heterocyclic carbon ring (Fig. 1(D)).¹⁸ They are present in a variety of plant types, with some structural differences, but the main classes are the flavones (e.g. apigenin) and flavonols (e.g. quercetin).¹⁸

Pterocarpan is a constituent of the isoflavonoids group and are categorized as phytoalexins. Phytoalexins are plants defensive agents, synthesized by plants against stress factors such as fungal infections and other micro pathogens, UV radiation, and high concentrations of metal salts.^{32–34} Some research groups have produced several synthetic compounds (Fig. 1(E)) by hybridizing quinones and pterocarpan, to improve their anti-parasitic properties.^{35–41}

Other molecules with important pharmacologic effects are the pyrazoles. Their structures contain a heterocyclic ring with two nitrogen atoms and two unsaturated bonds (Fig. 1(F,G)). Since the first synthesis of the pyrazole derivative compound, several applications have been described including, anti-inflammatory, analgesic, anti-cancer, anti-hypertensive, anti-microbial, anti-viral, anti-malarial and anti-leishmanial activities.^{29,42}

Hydroxyethylamine derivatives have an anti-viral action, working as an HIV protease inhibitor and also an anti-malarial action. These applications stimulated the interest in the production of the hydroxyethyl piperazine, a synthetic analog of anti-viral protease inhibitors.^{42,43} These studies also reported the discovery of the anti-leishmanial activity of this compound.⁴¹

Parasites of the genus *Leishmania* are heteroxenic, exhibiting two morphological forms in their life cycle. The intracellular amastigote form develops in the vertebrate host and the promastigote flagellate develops inside the gut of sand fly vectors.^{2,44,45}

It is necessary to investigate *Leishmania* interactions with its hosts and vectors, and not only with isolated parasites in culture. For example, when talking about studies of the influence of parasites resistance, the development in the vector and vectorial capacity has been unnoticed.¹³ It is in the gut of sandflies that *Leishmania* parasites need to overcome vector defense barriers, transform into different phases and amplify. This amplification process occurs by cell division and during there may be material exchange and generation of hybrids progeny. This hybridization may improve the fitness of parasite descendants, allowing the development of new characteristics (resistance) and increasing the numbers of infective sand fly vectors.¹³ All this makes the vector–*Leishmania* interaction even more complex, and a better comprehension of the vector is a key factor to control the disease.

Adult sand flies of both sexes feed routinely in sugar sources as nectar, honeydew, or fruit juices, and only females require a blood meal from a vertebrate host for egg development.^{4,46,47} In laboratory or field conditions, sand fly sugar meals are mimicked artificially using sugar baits (e.g. cotton embedded in a sugar solution). Importantly, it has been shown that the ingestion of

sugar by the sand fly is an important stimulus for the proper development of the *Leishmania* parasite.⁴⁸

Attractive toxic sugar baits containing insecticides or compounds anti-pathogens have been proposed for the control of sand flies and other dipterans in laboratory assays and the field in the last decades.^{22,23,49–56}

Recently, our group described that feeding *Lutzomyia longipalpis* females with a mixture of sugar and mandelonitrile (a PSM) before an infected blood meal, led to a reduction in the prevalence of females with *Leishmania mexicana* parasites in the gut and a reduction of the number of parasites per insect in those infected. These results demonstrated that mandelonitrile has an anti-leishmanial effect inside the gut of the vector.⁵⁷

The use of sugar baits for blocking the infection of the vector has been a promising strategy for the control of Leishmaniasis, potentially reducing the use of insecticides in the field and the development of insecticide resistance in sand fly populations. However, more studies are necessary to develop this approach, especially the search for more effective anti-parasitic compounds with no detrimental side effects for the vector, such as low palatability or repellence properties.

In this work, we tested the effect of different anti-*Leishmania* compounds in some aspects of the dietary physiology of *Lutzomyia longipalpis*, aiming for their future use in sugar baits for blocking the infection of the parasite in the vector. Amphotericin B, pentamidine, and several synthetic drugs, analogous to natural compounds, were screened and the most promising candidates were chosen based on their effects on the feeding behavior of sand fly adults. We describe in this report three lead compounds, **L6**, **P8**, and **P10**, with preference and stimulatory feeding properties for adult sand flies and identified compounds with repellent and anti-feeding actions that may be beneficial for other types of interventions targeting directly the insect vector.

2 MATERIAL AND METHODS

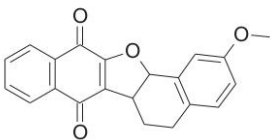
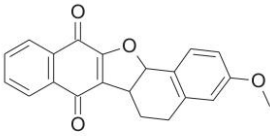
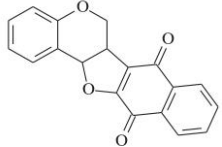
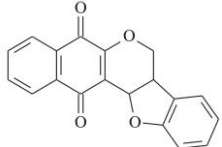
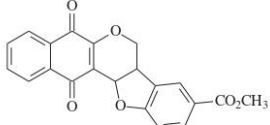
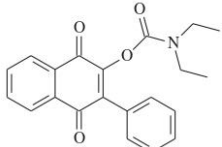
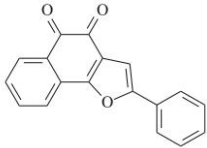
2.1 Chemicals

Sugary solutions were prepared with food grade sugar (sucrose), and the other substances tested were designed and synthesized in the Laboratory of Bioorganic Chemistry at the Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.⁴⁰ Table 1 summarizes the properties and concentrations of the compounds used in the experiments. Additionally, *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) (Cat. No. D100951; Sigma/Merck, Saint Louis, MO, United States) and a commercial repellent (OFF® Refresh; SC Johnson Company, Rio de Janeiro, Brazil) containing 15% (v/v) of DEET were used in repellence experiments. Unless stated, sugar solutions consist of 70% (w/v) food-grade sucrose.

2.2 Insects

All experiments were performed using *Lutzomyia longipalpis* sand flies (from Jacobina, Bahia, Brazil) reared in laboratory conditions. Insects were kept under standard laboratory conditions [temperature of 26 °C (± 2 °C) and relative humidity of $\geq 80\%$]. The eggs and larvae were kept in small plastic pots with a layer of plaster on the bottom and the adults, after the emergence from the pupae, were kept in cubic tissue cages with approximately 25 cm on each side.^{47,48} For routine rearing, adult sand flies were fed with 70% (w/v) autoclaved sucrose solution on cotton wool. For blood-feeding and oviposition, females were fed on golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) anesthetized with xylazine (10 mg kg⁻¹) plus ketamine (200 mg kg⁻¹).

Table 1. Properties and experimental conditions for anti-*Leishmania* compounds used in this work. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values (respectively for *Leishmania infantum* or *Leishmania amazonensis*) were described previously,^{35–41} or are unpublished data from our group. Compound volume 1: volume (in μL) of a 10 mmol L^{-1} solution of the compound in dimethyl sulfoxide (DMSO) added to 1 mL of sugar solution, in repulsion/attractiveness experiments (total volume used in each experiment 2 mL). Compound volume 2: volume (in μL) of a 1 mmol L^{-1} solution of the compound in DMSO added to 1 mL of sugar solution, in preference and intake experiments (total volume used in each experiment 100 μL).

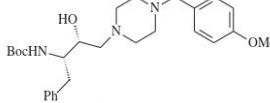
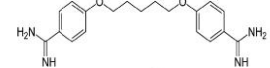
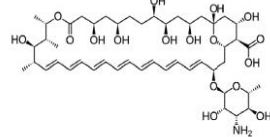
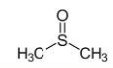
Compound	Classification/ function	Structure	IC_{50} <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> / <i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i>	Volume (10 mmol L^{-1})/sugar solution ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Volume (1 mmol L^{-1})/sugar solution ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
L1	Pterocarpanquinone		$2.2\ \mu\text{mol L}^{-1}$ /—	2.2	22.0
L2	Pterocarpanquinone		$1.4\ \mu\text{mol L}^{-1}$ /—	1.4	14.0
L3	Pterocarpanquinone		$1.0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ /—	1.0	10.0
L4	Pterocarpanquinone		$4.08\ \mu\text{mol L}^{-1}$ /—	4.1	41.0
L5	Pterocarpanquinone		—/ $2.8\ \mu\text{mol L}^{-1}$	2.8	28.0
L6	Pterocarpanquinone		—/ $1.98\ \mu\text{mol L}^{-1}$	2.0	20.0
L7	Pterocarpanquinone		$1.7\ \mu\text{mol L}^{-1}$ /—	1.7	17.0

2.3 Attractiveness/repulsive effects assays

This procedure was conducted as described in Ferreira *et al.*⁵⁷ Briefly, 50 adult sand flies (25 males and 25 females) newly

emerged from pupae (0–1 day) were placed in small cubic cages with 13 cm on each side. Flies were fed *ad libitum* with sugar solution in a piece of cotton for 1 to 2 days, and on the third day, the

Table 1. Continued

Compound	Classification/ function	Structure	IC ₅₀ <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> / <i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i>	Volume (10 mmol L ⁻¹)/sugar solution (μL mL ⁻¹)	Volume (1 mmol L ⁻¹)/sugar solution (μL mL ⁻¹)
P8	Pyrazole derived		—/ 1.8 μmol L ⁻¹	1.8	18.0
P9	Pentamidine - diamidine aromatic ring		5.7 μmol L ⁻¹ /—	5.7	57.0
P10	Amphotericin B - polyene		—/2.2 μmol L ⁻¹	2.2	22.0
DMSO	Solvent		—/—	6.0	57.0

cotton was removed. On the fourth day, 20 males and 20 females were separately placed in different acrylic cages. Acrylic cage dimensions were: height, 25.5 cm; width, 25.5 cm; length, 70 cm. The cage had an internal wall with holes for the passage of insects and was separated into two compartments with a length of 24 cm and 46 cm. The larger side contained a piece of cotton soaked in 2 mL of a 70% (w/v) sucrose solution (control) or sucrose mixed with an experimental compound. The compound concentrations used were ten times the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) previously reported from *in vitro* assays with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania infantum* (see Table 1). Experimental compounds were diluted from 10 mmol L⁻¹ stocks of the compounds in dimethyl sulfoxide (DMSO) into the sugar solution, and the final concentration of DMSO was up to 5.7% (see Table 1). Two additional tests compared sucrose versus sucrose plus DMSO, with males and females. These experiments were conducted at 26 ± 1 °C and 50–60% of humidity. The sand flies were inserted in the smaller side, and after 1, 2, and 3 h, the number of insects migrating to the larger side was recorded. The same procedure was performed mixing DEET 97% with the sugar solution to get the same concentration of a commercial repellent preparation (15%). In addition, tests were conducted in the same way mixing a commercial repellent containing 15% of DEET to the sugar using the volume of the highest IC₅₀ compound (pentamidine, see Table 1). All experiments were made with 3–5 biological replicates with 20 insects per cage.

To assess whether the repellency methodology using this type of cage would be efficient, we adapted the repulsion procedures tests using live baits described in the literature.^{58–60} The assay was adapted using an anesthetized live bait (golden hamster) covered with netting. Twenty females were inserted in the cage, with access to the front legs and a bare abdomen area of 7 cm². The mentioned regions in the control cage received only solvent (32 μL of ethanol PA), while the experimental cage received the

commercial repellent DEET (commercial repellent, 15%). The migration of the females, engorgement, and the number of insects close to the hamster were evaluated every 30 min for 3 h. All experiments were performed according to the Human and Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute License number CEUA L-029/2016.

2.4 Detection and quantification of the dietary intake of compounds

This procedure was conducted according to da Costa *et al.*⁶¹ and Ferreira *et al.*⁵⁷ Briefly, 20 adult sand flies, males or females tested separately, were captured until 12 h after emergence from pupae and inserted in small cubic cages (13 cm each side). Flies were offered simultaneously two different diets: (1) sucrose 70% (w/v) mixed with orange or green food dye 5% (v/v) (Mix, Brazil) (ratio 1:1) and (2) mixture above with dye different from (1) (orange or green) containing one of the experimental compounds (see Table 1 for volumes). The concentration of the compounds was ten times the IC₅₀ concentration (see Table 1). The colors of the two diets were alternated from one experimental replica to another to avoid bias. All experiments were made in three biological replicates and the volumes were measured in individual samples (volume per crop of sand fly).

Each diet was offered in 20 drops of 5 μL, totaling 100 μL, on a parafilm-covered Petri dish to prevent drop dispersion. The experiments were conducted at 26 ± 1 °C and 50–60% of humidity. After 2 days of exposure, insects were dissected and crops were homogenized individually in 3 μL of deionized water (MilliQ; Millipore, Bedford, MA, USA). For quantification, 1 μL of each sample was used to absorbance readings in a Nanodrop® 2000C (Thermo, Waltham, MA, USA) at 420, 450, and 480 nm, respectively the maximum wavelengths for the green, the mixture (1:1), and the orange dye. Calculation of the amount of ingested

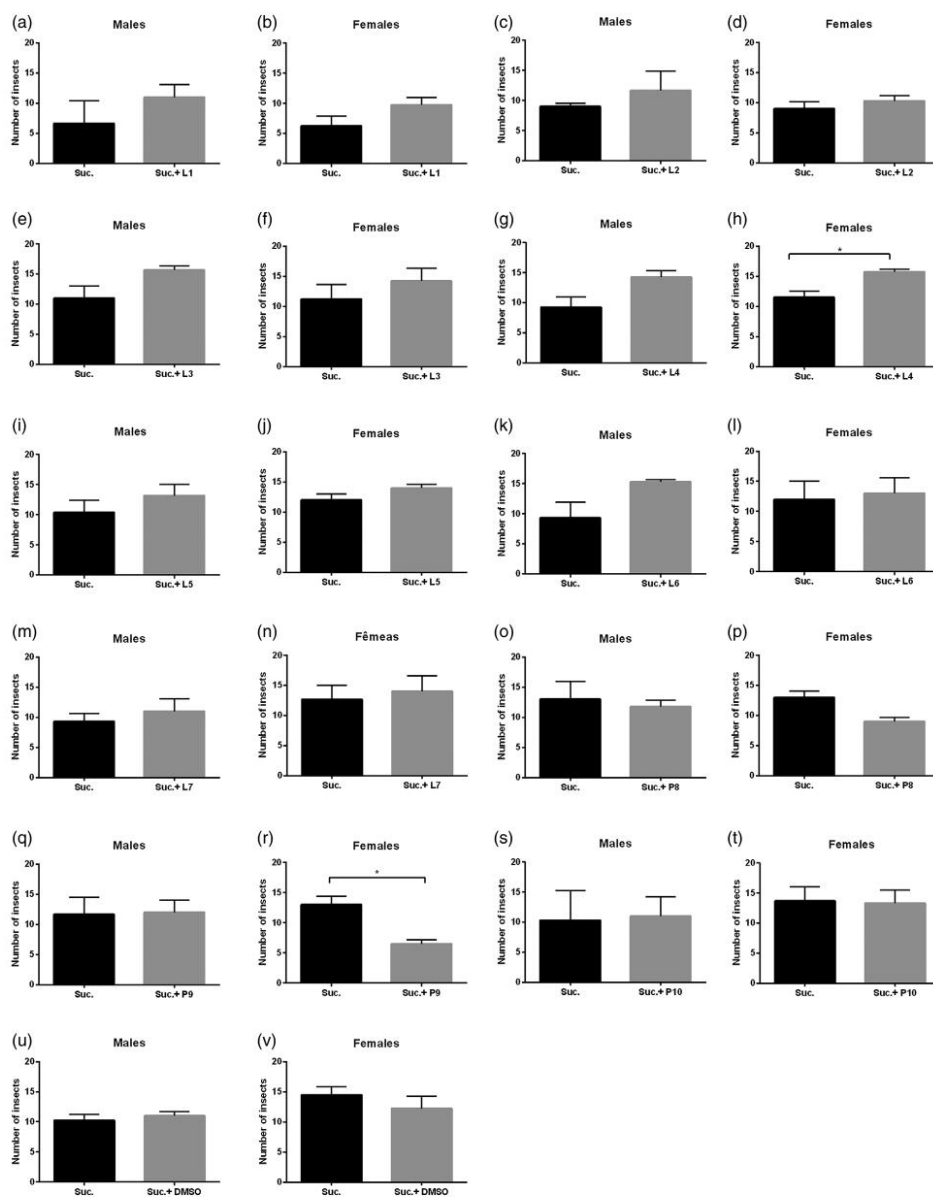


Figure 2. Attractive/repulsive effect of tested compounds in *Lutzomyia longipalpis*. Adult sand flies (4–5 days old), males or females, were placed inside an acrylic cage containing, in one of its extremities, a piece of cotton wool soaked in a sugar solution containing tested compounds or sugar only. Insect numbers on both sides of the cage were recorded at 1, 2, and 3 h after release. The mean number of insects in the cage side with the cotton, after 3 h is reported. Effect of tested compounds in adult males (a), (c), (e), (g), (i), (k), (m), (o), (q), (s), (u). Effect of tested compounds in adult females (b), (d), (f), (h), (j), (l), (n), (p), (r), (t), (v). Compound **L1** (a), (b). Compound **L2** (c), (d). Compound **L3** (e), (f). Compound **L4** (g), (h). Compound **L5** (i), (j). Compound **L6** (k), (l). Compound **L7** (m), (n). Compound **P8** (o), (p). Compound **P9** (q), (r). Compound **P10** (s), (t). Solvent DMSO (u), (v). Results are presented as the mean \pm standard error of the mean of three to five biological replicates with 20 insects per cage. Mann–Whitney non-parametric test, * $P = 0.0286$ for compounds **L4** (h) and **P9** (r).



dye (and the corresponding amount of sucrose solution) was performed with a standard curve of the dye diluted in water.

The preference between diets was measured by counting the number of insects with crop contents of each color (green, orange, or mixture), and expressed as a percentage of the total of insects.

2.5 Statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Prism version 6 software for Windows. Gaussian normality of data distributions was determined by the D'Agostino and Pearson test. Data that had normal distributions were submitted to unpaired *t*-test or analysis of variance (ANOVA ordinary one-way) with Tukey's multiple comparisons post-test. Data with non-normal distributions were analyzed with the non-parametric Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons post-test. All comparisons with a *P*-value < 0.05 were classified as statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Attractiveness and repulsive effects

Initially, we tested if the compounds had an odor that would alter the sand flies' movement in a partially closed system, because

repellent or attractant properties may have a great impact on the efficiency of sugar baits. Among the tested compounds (Table 1), **L1–L7** are pterocarpanquinones (quinone and pterocarpan hybridization products), **L6** has a nitrogen atom forming an amide group and **L7** is an ortho-quinone (carbonyl groups in positions 1 and 2 of the quinone ring). **P8** is a pyrazole derivative compound, **P9** is pentamidine, and **P10** is amphotericin B.

Most compounds did not influence the migration of the sand flies inside the cage. In these cases, we observed several insects in the cage compartment with the sugar bait containing the compound that was statistically similar to that followed with sucrose only (Fig. 2). However, we observed some female insects in compartments with sugar baits containing compound **L4** that was significantly higher than controls with sucrose only (Fig. 2(h)). In contrast, cage compartments with sugar baits containing compound **P9** had female numbers that were significantly lower than controls with sucrose only (Fig. 2(r)). Therefore, compounds **L4** and **P9** had attractant and repellent activities, respectively.

To check if our experimental setup was adequate to evaluate repellent effects, we evaluated the repellency and protection time of marketable DEET using an animal bait. Our major concerns were about the dimensions of the acrylic cage, and the sand fly lineage used in the test. The sand flies of our laboratory came

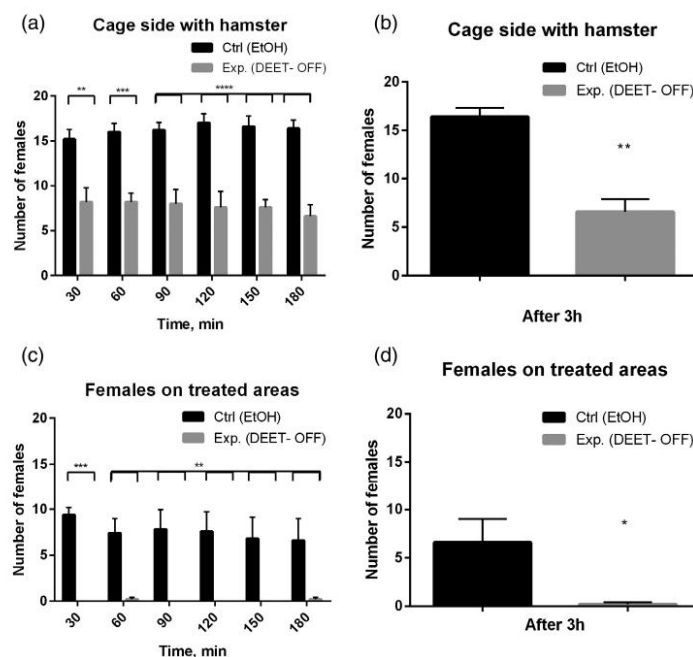


Figure 3. Repulsive effect test in *Lutzomyia longipalpis* females using trademark repellent (DEET). Twenty adult female sand flies (4–5 days old) were placed inside an acrylic cage containing, in one of its extremities, a hamster treated with commercial DEET or solvent only [ethanol (EtOH)]. Insect numbers on both sides of the cage were recorded at 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min after release. (a) The number of insects in the cage side with the hamster over time under both conditions. ANOVA Sidak's multiple comparisons test. Control versus DEET/OFF* 30 min ***P* = 0.001, 60 and 90 min ****P* = 0.0002 and 0.0001, respectively, and 120–180 min *****P* < 0.0001. (b) The number of insects in the hamster side of the cage after 3 h. Mann–Whitney test, *P* < 0.01 (0.008). (c) The number of insects on the hamster skin treated with DEET or ethanol over time. ANOVA Sidak's multiple comparisons test. 30 min ****P* = 0.0006, 60–180 min, *P* < 0.005 (0.0021 or 0.0011). (d) The number of insects on the hamster skin treated with DEET or ethanol after 3 h. Results are presented as the mean ± standard error of the mean of five biological replicates with 20 insects per cage. Mann–Whitney test, *P* < 0.05 (0.048).

from a creation that was established 40 years ago by Prof. Richard Ward in the United Kingdom. The insects were originally collected in Jacobina, Bahia state, Brazil.⁶² It is an important lineage of *Lutzomyia longipalpis*, that was used for several physiological studies, including the sequencing of its genome.⁶³ However, the behavior of these insects in repellency tests was never described.

Our results confirmed that the commercial repellent has a repulsive effect against sand flies since a smaller number of females stayed on the experimental cage's side when compared to the control, a hamster treated with solvent only (ethanol). The effect remained over the 3 h observed (Fig. 3). However, when we tested the repellence properties of DEET using the concentrated reagent (97%) mixed with the sugar solution in a piece of cotton, the same methodology that was used for the tested compounds, we observed no repellency for 15% DEET (same concentration of the commercial repellent) (Fig. 4).

3.2 Detection and quantification of intake of compounds

For detection and quantification of the intake of test compounds, we exposed adult sand flies to drops of sugar solutions containing experimental compounds and green or orange food dyes, as well as, control drops with sucrose and dye only in the same cage. These two colors were selected after preliminary tests observing the number of the insects, males or females, that were chosen for sugar meals containing one or other dye until we found a pair

that had similar numbers for both dyes. We mixed green or orange food dyes in the sugar meals containing the compounds (or controls with sucrose only) and measured the ingestion of each compound by detecting the correspondent dye in individual gut samples.

In these experiments, the insects could choose between the diet containing the compound or a control diet with sucrose only. In each biological replicate, the colors of the dyes were alternated between the test and control diets to avoid any color bias. Compounds **L1** (females), **L3** (females), **L4** (males), **L5** (males and females), **L7** (females), **P8** (males), and **P10**/amphotericin (males) had anti-feeding effects (Fig. 5) since the sand flies ingested smaller volumes of the diet containing the compounds when compared to the volume ingested by insects that fed on the control diet only or both diets. In other experiments, with compounds **L1** (males), **L2** (males and females), **L3** (males), **L4** (females), **L6** (males and females), **L7** (males), **P8** (females), and **P9**/pentamidine (males and females), **P10**/amphotericin (females), and DMSO (males and females), no difference in intake volume was detected when comparing insects fed in test diets with insects fed in the control diet (Fig. 5).

Preference was also analyzed by considering the number of insects that fed on test diet, control, or both diets. Sand flies had a preference for control diets over the diets containing **L1**, **L2** (females), **L3**, **L4**, **L5**, **L6**, **L7** (males), **P8** (males), and DMSO

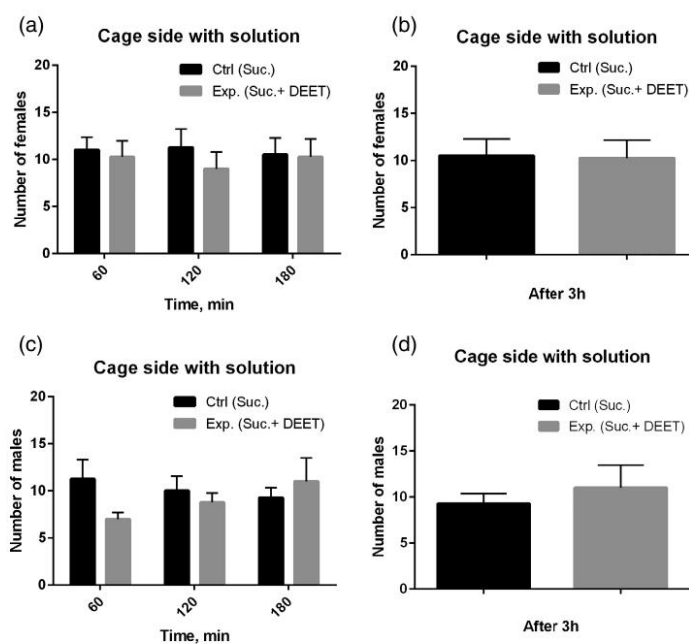


Figure 4. Repulsive effect test *Lutzomyia longipalpis* females and males previously fed with sugar solution. Twenty adult sand flies (4–5 days old) were placed inside an acrylic cage containing, in one of its extremities, a piece of cotton wool soaked in a sugar solution containing 15% DEET or sugar only. Insect numbers on both sides of the cage were recorded at 1, 2, and 3 h after release. The figure shows the mean number of insects in the cage side with the cotton. The number of insects in the cotton side of the cage over time (a), (c). The number of insects in the cotton side of the cage after 3 h (b), (d). Experiments were performed with females (a), (b), or males (c), (d). No statistically significant differences were detected between treatments in any group/condition. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean of three biological replicates with 20 insects per cage.

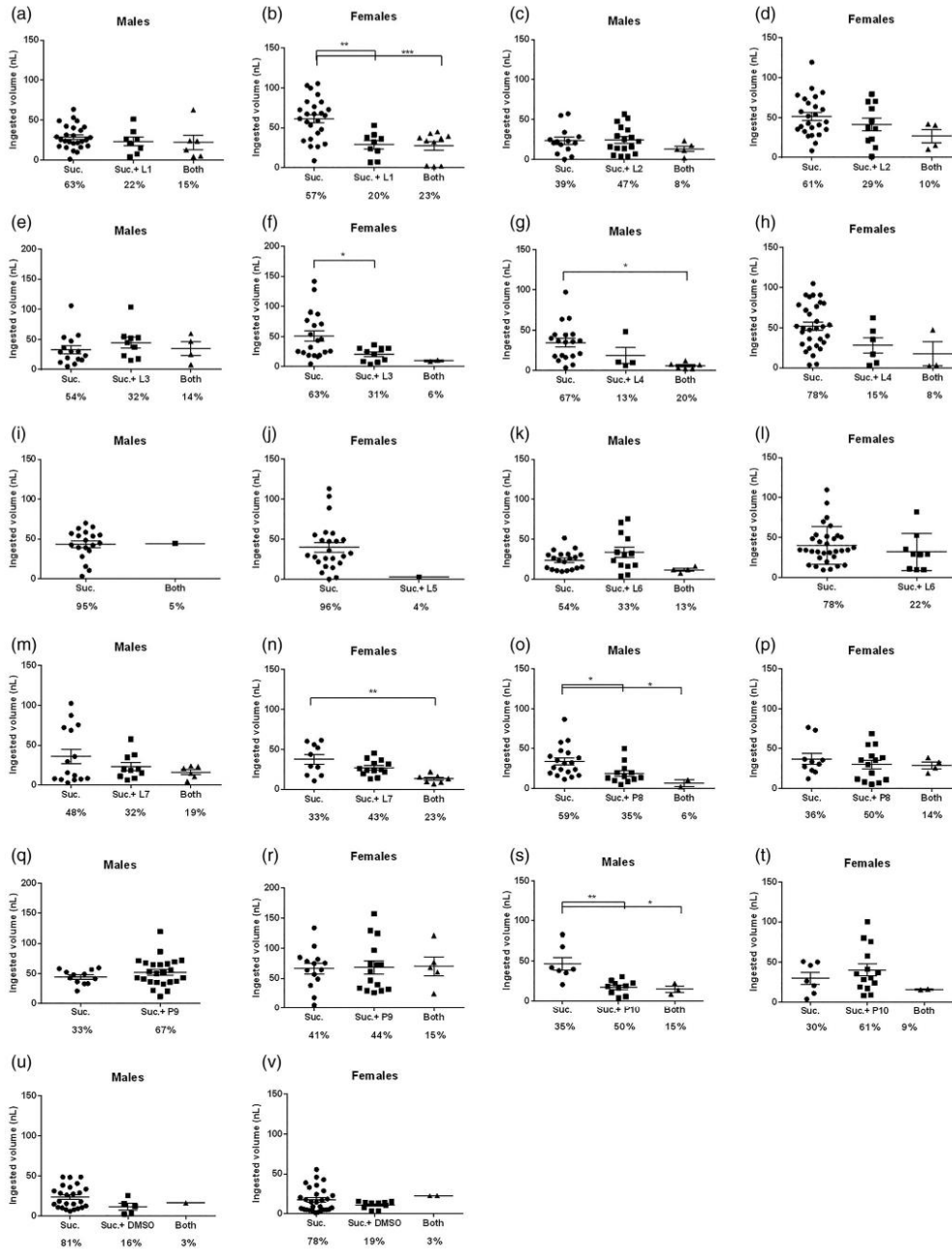


Figure 5. Ingestion of different sugar solutions by adults of *Lutzomyia longipalpis*. Insects (0–1 days old) were kept for 2 days in cages, where they were separated from the control (sucrose + dye 1) and the experimental (sucrose + dye 2 + test compound) diets simultaneously in droplets (see Material and Methods for details). Each dot represent the ingested volume by one individual insect, and the line plus error bars show mean \pm standard error of the

(Fig. 5). When the compounds **L2** (males), **L7** (females), **P8**, **P9** (males), and **P10** were used, the number of insects choosing the experimental diet was higher than those who fed on the control with sugar only (percentages in Fig. 5).

These results were expressed as percentages due to the variability in the number of measurements between experiments, caused by the death of some insects in some experiments, failure during dissection to remove only the diverticulum and consequent loss of samples, and also insects that did not feed at all, or ingested very low or undetectable amounts of the solutions. These limitations occurred more frequently in the experiments with compound **L5** (21 males and 26 females analyzed) and with amphotericin (20 males and 23 females analyzed).

4 DISCUSSION

In this work, we described the effects of several anti-*Leishmania* drugs in the feeding physiology of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. These properties are relevant considering the inclusion of anti-*Leishmania* compounds in sugar baits targeting the development of the parasite inside the gut of the vector, a new strategy for the control of leishmaniasis that was presented in previous work.⁵⁷ It is desirable that a compound included in sugar baits works as an attractant or stimulates the sugar intake, or at least does not show repellent or anti-feeding properties. In this respect, synthetic pterocarpanquinones and a pyrazole derivative, as well as, anti-leishmanial reference compound pentamidine and amphotericin B were assessed for their effects on the physiology of sand flies. These properties have not previously been explored for these substances. Remarkably, the compounds pentamidine and amphotericin were used only as a positive control for the experiments, knowing that they already have leishmanicidal effects in the vertebrates host.

Most of the compounds tested did not influence the migration of the insects in the conditions studied, likely because they are not volatile or are only semi-volatiles in the concentrations used. In the conditions used, the sand flies were unable to smell them, being not stimulated to migrate preferentially from one chamber to another. Only **L4** and **P9** presented attractive and repulsive effects, respectively. It is important to mention that these compounds were tested in higher concentrations than the other molecules due to their high IC_{50} values in the *in vitro* tests against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* (see Table 1).

The repulsive effects of pentamidine might be explained by the presence of the amino group ($-NH_2$) in the aromatic ring, which may create some unpleasant odor for females since compounds derived from ammonia have this characteristic.^{8,10}

Unlike terpenes (another class of PSM), quinones and pterocarpanes do not usually show stronger volatility and repellent effects in arthropods. Some quinones or pterocarpanes may have some arthropod-repellent properties due to the presence of oxygen,

with one hydroxyl group linked to a primary, secondary, or aromatic carbon.⁶⁴ This absence of volatility was reported to banks of chemical and physical properties.⁶⁵

It is important to consider that females may have an olfactory apparatus sensitive and capable of detecting some of the partial structures used, as they are analogous to natural compounds. The hybridization may have altered their organoleptic and conformational properties, especially for substances **L1–L3** and **L5–L7**.

When using a commercial repellent product containing DEET 15% (OFF[®]), and an animal bait (Fig. 3), results of repellence were similar to those previously described in the literature.^{4,60,66–68} These results demonstrated that our experimental setup was adequate and that our *Lutzomyia longipalpis* strain, despite being kept in the laboratory for several decades, can be used for this type of behavior test. However, adding DEET to the sugar solution in the same concentration resulted in no repellence activity. This strongly suggests the importance, in the live bait, of corporal temperature, carbon dioxide (CO_2), and other host's odor constituents such as carboxylic acids, ketones, and aldehydes, that are requisites to the attractive or repulsive effects.⁶⁹

The colors of the different dyes used in the ingestion experiments (green – 420 nm; orange – 480 nm; mixture – 450 nm) did not influence the behavior of insects, which is consistent with the previous reports from Gaglio et al.⁷⁰ and Mellor et al.⁷¹ that showed that *Lutzomyia longipalpis* act in response to lights in the UV region (340 nm) and the region at 520–546 nm.

There seem to be differences between the sexes depending on the compound tested. Four substances reduced the amount of sugar solution ingested by females (pterocarpanquinones **L1**, **L3**, **L5**, and **L7** – Fig. 5 and Table 2), while in males the same effect was observed in other compounds (pterocarpanquinone **L4**, **L5**, **P8**, and **P10** – Fig. 5 and Table 2). Only **L5** (Fig. 5(i,j)), a pterocarpanquinone, had anti-feeding effects in both sexes. In the context of vector control, molecules with anti-feeding effects in females, like the pterocarpanquinones **L1**, **L3**, **L5**, and **L7**, are not good candidates for sugar bait development and should be excluded from future studies. However, these deterrents compounds may be useful for interventions aiming at the inhibition of sand fly feeding.

The anti-feeding effect of quinones in *Spodoptera litura* has been already described, and tests using extracts of the plant's *Cyperus nipponicus* and *Cyperus distans*, containing cyperquinone and scabequinone, presented the same influence against the tobacco cutworm.³²

Some pterocarpanes also present an anti-feeding effect. *Pterocarpus macrocarpus* (Fabaceae), for example, is used to make furniture, as it prevents termite attacks. This activity was also observed for homopterocarpin, pterocarpin, and hydroxyhomopterocarpin, against the subterranean termite *Reticulitermes speratus*, and for natural flavonoids against the larvae of *Spodoptera litura*.³² To our knowledge, only quercetin (other PSM, a

mean of three to four biological replicates. Dye color was alternated between control and experimental diets among the biological replicates and the volumes were measured in individual samples (volume per crop of sand fly). Effect of tested compounds in adult males (a), (c), (e), (g), (i), (k), (m), (o), (q), (s), (u). Effect of tested compounds in adult females (b), (d), (f), (h), (j), (l), (n), (p), (r), (t), (v). Compound **L1** (a), (b). Compound **L2** (c), (d). Compound **L3** (e), (f). Compound **L4** (g), (h). Compound **L5** (i), (j). Compound **L6** (k), (l). Compound **L7** (m), (n). Compound **P8** (o), (p). Compound **P9** (q), (r). Compound **P10** (s), (t). Solvent DMSO (u), (v). Tukey's multiple comparisons test, (b) $^{***}P = 0.0015$ and $^{***}P = 0.0006$, (f) $^*P = 0.0498$, (g) $^*P = 0.0027$, (n) $^{**}P = 0.0022$, (o) $^*P = 0.0402$ and $^*P = 0.0325$, (s) $^{**}P = 0.0097$, and $^*P = 0.0443$. Compound **L5** statistics were not performed because only one insect fed in the diet containing the compound. No statistically significant difference was detected for the other compounds. The percentages below the graph represent the proportion of insects that opted for each diet. The results represent the average of three to four biological replicates of measurements made on individual samples. Abbreviations: Suc., 70% w/v sucrose solution + dye 50% v/v; Suc. + compound letter/number, 70% w/v sucrose solution + 50% v/v dye + compound at $10\times IC_{50}$.

Table 2. Summary of properties observed for all compounds tested. **L4** and **P9** showed attractant and repellent properties against females, respectively. C, preference for ingestion of control with sucrose only; T, preference for ingestion of diet with a test compound; AF, anti-feeding effect; —, no difference observed between an experimental diet with a test compound and controls with sucrose only

	Preference		Ingestion	
	♀	♂	♀	♂
L1	C	C	AF	—
L2	C	—	—	—
L3	C	C	AF	—
L4	C	C	—	AF
L5	C	C	—	—
L6	C	C	—	—
L7	T	C	AF	—
P8	T	C	—	AF
P9	—	T	—	—
P10	T	T	—	AF
DMSO	C	C	—	—

polyphenolic flavonoid) was demonstrated to affect parasites and insects. The molecule presented anti-*Leishmania* effect,^{12,27,72} is also an inhibitor of insect feeding.^{12,27,32,72,73}

Although very few compounds showed repellent or attractant effects in preference tests, seven were avoided as food by females, while males preferred sugar only over eight of the molecules tested. Five compounds were avoided by both sexes (pterocarpanquinones **L1**, **L3**, **L4**, **L5**, **L6**, besides the solvent DMSO, Fig. 5 and Table 2). Conversely, males presented preference for two molecules, **P9** (pentamidine) and **P10** (amphotericin B), and females for three of them, **L7** (pterocarpanquinone), **P8** (pyrazole derivative), and **P10**. Only **P10** was preferred by both sexes (Fig. 5 (s,t) and Table 2).

L5 was the compound that resulted in the lowest intake frequencies in both sexes, and the other pterocarpanquinones presented varied results. **L7** and **P8** showed negative responses in males, but positive results with females. In this respect, these last drugs may be further developed, together with **P9** and **P10**, as they do not impair the preference of females, which are the primary target for an anti-*Leishmania* strategy.

Different from the other molecules tested here, **P8** is derived from pyrazole. This class of compounds has already been shown to have insecticidal activity against a lepidopteran (*Mythimna separata* (Walker)) and a dipteran (*Culex pipiens pallens*).²⁹ This may have some relation to the lower solution intake and the rejection of this compound by males, but it does not explain the preference effect in females (Fig. 5(o,p) and Table 2). Nevertheless, it has been shown that males and females of *Lutzomyia longipalpis* can have very different susceptibilities to specialized plant metabolites.⁵⁷

P10 (amphotericin B), a compound that was preferred by both sexes. Amphotericin B affects the fungal cellular integrity, having the ergosterol in the fungal cell membrane as a target.^{8,9} This property is probably due to the amphiphilic structure of the amphotericin B, with the presence of hydroxyl groups and a long chain of unsaturated carbons. Further studies may confirm whether this property is important for its preference in both sexes, and specific anti-feeding action in males. Results like these reinforce particularities between males and females and flies, and

the necessity for further studies related to vector physiology with different compounds.

The compounds tested can be classified depending on their potential as candidates for further anti-*Leishmania* sugar bait development. In this respect, negative effects on females had greater weight in this classification. Thus, **L2**, **L7**, and **P9** were considered reasonable. The first only affected females in preference tests, but not in the volume ingested. **L7** caused a reduction in volume ingested, but only when insects fed on both diets, and was preferred by females in comparison to the control diet. **P9**/pentamidine, despite having a repulsive effect, did not reduce the volume ingested and was preferred by males.

Compounds **L6**, **P8**, and **P10** were considered good candidates for infection and field trials. **L6** had no repulsive effect on both sexes and did not influence intake. **P8** also had no repulsive effect, was preferred by females, and only affected the intake in males, which are not blood feeders. Finally, **P10** (amphotericin B) had no repulsive action, was preferred by both sexes, and, similarly to **P8**, had anti-feeding activity only against males. These three compounds were considered good candidates for further development of our strategy for blocking the transmission of *Leishmania* parasites by adult sand flies. Nevertheless, it is very important to consider that deploying any anti-parasitic compound in the field may have unexpected consequences in the selection of resistant strains. In this way, this line of research is preliminary and must be interpreted as a proof of concept investigation. The impact of these sugar baits in the parasite populations must still be assessed, initially in the laboratory and then in semi-field trials.

5 CONCLUSIONS

Most of the compounds tested did not show repulsive or attractive effects against sand flies. Only **L4** (a pterocarpanquinone) and **P9** (pentamidine) showed attractive and repellent activities, respectively. DEET has a potent repellent activity when used in an animal bait, but has no effect when included in the sugar solution. Compounds **L1**, **L3**, and **L7** had anti-feeding activities for females, and **L4/P8** and **P10** for males. Compounds **L7** and **P8** were preferred by females, and **P9** by males. **P10** was preferred by adult sand flies of both sexes. Taken together, **L6**, **P8**, and **P10** are the most promising compounds for the future development of anti-*Leishmania* sugar baits.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr Bruno Gomes da Silva (IOC-Fiocruz) and Dr Samara Graciane da Costa Latgé (IOC-Fiocruz) for critical reading of the manuscript. This work was funded by the Brazilian Research agencies FAPERJ, CAPES, CNPq, and Fiocruz.

FUNDING

This work was funded by the Brazilian Research agencies FAPERJ, CAPES, CNPq, and Fiocruz. TNF is a PhD student of the Postgraduate Program in Parasite Biology of the Oswaldo Cruz Institute. RPB, MAM, EFC-J, ECTS, and FAG are staff members of their respective departments.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

ETHICS APPROVAL

All procedures relating to animals were approved by the Animal Research Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC license number L-029/2016).

CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

CODE AVAILABILITY

Not applicable.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

TNF, RPB, MAM, ECTS, EFC-J and FAG conceived and designed the experiments. TNF and FAG conducted the experiments and analyzed the data. PRRC and CDN designed and synthesized the test compounds. TNF and FAG wrote the initial manuscript. All authors read and approved its final form.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Pan American Health Organisation. PAHO (2021). Leishmaniasis. Access on January 16th, 2021 and available in https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=en
- Steverding D, The history of leishmaniasis. *Parasites Vectors* **10**:1–10 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
- World Health Organization (WHO). *Leishmaniasis*. World Health Organization, Switzerland (2021). Access on January 16th, 2021 and available in <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Ready PD, Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* **58**:227–250 (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>.
- Brasil República Federativa do, *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*, 1st ed., MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brazil (2014). Retrieved from, https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_1edicao.pdf.
- Brasil, M. da S. (2017). *Manual de vigilância da LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (2^o);* Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, ed.
- Mansueto P, Seidita A, Vitale G and Cascio A, Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Med Infect Dis* **12**:563–581 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.09.007>.
- PUBCHEM1 (2021). U.S. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology homepage Information about Amphotericin-B. Access on March 17th, 2020 and available in <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amphotericin-B>
- Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP and Singh RK, Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of Leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* **18**:26–41 (2018). <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105129>.
- Pépin J and Milord F, The treatment of human African Trypanosomiasis. *Adv Parasitol* **33**:1–47 (1994). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60410-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60410-8).
- PUBCHEM2 (2021). U.S. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology homepage Information about Pentamidine. Access on March 17th, 2020 and available in <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pentamidine>
- Tiuan TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD and Nakamura CV, Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* **15**:e525–e532 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>.
- Van Bockstal L, Hendrickx S, Maes L and Caljon G, Sand Fly studies predict transmission potential of drug-resistant Leishmania. *Trends Parasitol* **36**:785–795 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.06.006>.
- Almeida-amarel EE, Use of natural products in Leishmaniasis chemotherapy: an overview. *Front Chem* **8**:1–43 (2020). <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.579891>.
- Marques MCS, Hamerski L, Garcez FR, Tieppo C, Vasconcelos M, Torres-santos EC et al., In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado. *J Med Plants Res* **7**:957–962 (2013). <https://doi.org/10.5897/JMPR12.882>.
- Beran F, Köllner TG, Gershenzon J and Tholl D, Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytol* **223**:52–67 (2019). <https://doi.org/10.1111/nph.15718>.
- Kessler A and Kalske A, Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annu Rev Ecol Syst* **49**:115–138 (2018). <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062406>.
- Pengelly A, in *The Constituents of Medicinal Plants*. 2nd ed., Routledge, London (2004). Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/97811003117964/constituents-medicinal-plants-andrew-pengelly-kerry-bone?mckid=05039db2c7f711ecb875b86cd68988ad>.
- Peres LEP, *METABOLISMO SECUNDÁRIO*. Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, pp. 1–26. (2021). Retrieved from <http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploads/professor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86f80010a253f33762>.
- Wink M, Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* **9**:1–9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00364>.
- Jacobson RL and Schlein Y, Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. *Ann Trop Med Parasitol* **93**:351–356 (1999). <https://doi.org/10.1080/00034983.1999.11813431>.
- Schlein Y and Jacobson RL, Mortality of Leishmania in Phlebotomus of the sand flies. *Am J Trop Med Hyg* **50**:20–27 (1994).
- Junnila A, Müller GC and Schlein Y, Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. *J Vector Ecol* **36**:S206–S211 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00132.x>.
- Müller GC and Schlein Y, Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. *J Vector Ecol* **36**:S64–S70 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00113.x>.
- Schlein Y and Müller G, Assessment of plant tissue feeding by sand flies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **32**:882–887 (1995). <https://doi.org/10.1093/jmedent/32.6.882>.
- Schlein Y, Jacobson RL and Müller GC, Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **65**:300–303 (2001). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.300>.
- Sen R and Chatterjee M, Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* **18**:1056–1069 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.004>.
- Boeck P, Bandeira Falcão CA, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-santos EC et al., Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem* **14**:1538–1545 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.005>.
- Küçükgüzel G and Şenkardeş S, Recent advances in bioactive pyrazoles. *Eur J Med Chem* **97**:786–815 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.059>.
- Silva MN d, Ferreira VF and de Souza MCBV, Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na betalapachona e derivados. *Quim Nova* **26**:407–416 (2003). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>.
- Sousa ET, Lopes WA and De Andrade JB, Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Quim Nova* **39**:486–495 (2016). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160034>.

- 32 Drijfhout FP and Morgan ED, Terrestrial natural products as antifeedants, in *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp. 457–501 (2010). <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00103-9>.
- 33 Netto CD, da Silva AJM, Salustiano EJS, Bacelar TS, Riça IG, Cavalcante MCM *et al.*, New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorg Med Chem* **18**:1610–1616 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.073>.
- 34 Selvam C, Jordan BC, Prakash S, Mutisya D and Thilagavathi R, Pterocarpan scaffold: a natural lead molecule with diverse pharmacological properties. *Eur J Med Chem* **128**:219–236 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.023>.
- 35 Buarque CD, Militão GCGG, Lima DJBB, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, Odorico M *et al.*, Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. *Bioorg Med Chem* **19**:6885–6891 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.025>.
- 36 Cunha-júnior EF, Martins M, Canto-cavalheiro MM, Marques R, Portari EA, Pinto G *et al.*, Preclinical studies evaluating subacute toxicity and therapeutic efficacy of LQB-118 in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:3794–3801 (2016). <https://doi.org/10.1128/AAC.01787-15>.
- 37 da Silva AJM, Netto CD, Pacienza-Lima W, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B, Maurel S *et al.*, Antitumoral, Antileishmanial and antimalarial activity of Pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. *J Braz Chem Soc* **20**:176–182 (2009). <https://doi.org/10.1590/s0103-50532009000100026>.
- 38 VDS F, da Frota LCRM, Cunha-Junior EF, JCF B, Da Silva T, Netto CD *et al.*, Second-generation pterocarpanquinones: synthesis and antileishmanial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **24**:1–11 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0174-7>.
- 39 de Melos JL, Torres-Santos EC, Faiões Vdos S, Del Cistia Cde N, Sant'Anna CM, Rodrigues-Santos CE *et al.*, Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. *Eur J Med Chem* **103**:409–417 (2015).
- 40 Ribeiro GA, Cunha-ju F, Pinheiro RO, Silva M, Canto-cavalheiro MM, Jose A *et al.*, LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* **68**:789–799 (2013). <https://doi.org/10.1093/jac/dks498>.
- 41 Vasconcelos MF d, Cunha-Júnior EF d, Andrade-Neto WV d, Siqueira LM, D'Avila-Levy CM, Moreth M *et al.*, Oral effectiveness of PMIC4, a novel hydroxyethylpiperazine analogue, in *Leishmania amazonensis*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **4**:210–213 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.005>.
- 42 Cunico W, Cechinel CA, Bonacorso HG, Martins MAP, Zanatta N, De Souza MVN *et al.*, Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **16**:649–653 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.033>.
- 43 Cunico W, Gomes CRB, Moreth M, Manhanini DP, Figueiredo IH, Penido C *et al.*, Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. *Eur J Med Chem* **44**:1363–1368 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.04.009>.
- 44 Sádlová J and Volf P, Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell Tissue Res* **337**:313–325 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0802-1>.
- 45 van Griensven J and Diro E, Visceral Leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infect Dis Clin North Am* **33**:79–99 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>.
- 46 Brazil RP and Brazil BG, Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies, *Brazilian Sand Flies*. Elsevier, Cham, Switzerland, pp. 299–318 (2018). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1>.
- 47 Moraes CS, Aguiar-Martins K, Costa SG, Bates PA, Dillon RJ and Genta FA, Second blood meal by female *Lutzomyia longipalpis*: enhancement by oviposition and its effects on digestion, longevity, and *Leishmania* infection. *Biomed Res Int* **2018**:1–10 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>.
- 48 da Costa SG, Bates P, Dillon R and Genta FA, Characterization of α -glucosidases from *Lutzomyia longipalpis* reveals independent hydrolysis systems for plant or blood sugars. *Front Physiol* **10**:1–15 (2019a). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00248>.
- 49 Diarra RA, Traore MM, Junnila A, Traore SF, Doumbia S, Revay EE *et al.*, Testing configurations of attractive toxic sugar bait (ATSB) stations in Mali, West Africa, for improving the control of malaria parasite transmission by vector mosquitoes and minimizing their effect on non-target insects. *Malar J* **20**:1–10 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03704-3>.
- 50 Fiorenzano JM, Koehler PG and Xue RD, Attractive toxic sugar bait (ATSB) for control of mosquitoes and its impact on non-target organisms: a review. *Int J Environ Res Public Health* **14**:398 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijerph14040398>.
- 51 Fraser KJ, Mwandigha L, Traore SF, Traore MM, Doumbia S, Junnila A *et al.*, Estimating the potential impact of attractive targeted sugar baits (ATSBs) as a new vector control tool for plasmodium falciparum malaria. *Malar J* **20**:1–14 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03684-4>.
- 52 Maia MF, Tenywa FC, Nelson H, Kambagha A, Ashura A, Bakari I *et al.*, Attractive toxic sugar baits for controlling mosquitoes: a qualitative study in Bagamoyo, Tanzania. *Malar J* **17**:22 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2171-2>.
- 53 Müller GC, Junnila A, Qualls W, Revay EE, Kline DL, Allan S *et al.*, Control of *Culex quinquefasciatus* in a storm drain system in Florida using attractive toxic sugar baits. *Med Vet Entomol* **24**:346–351 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00876.x>.
- 54 Qualls WA, Müller GC, Khallaayoune K, Revay EE, Zhioua E, Kravchenko VD *et al.*, Control of sand flies with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in Morocco. *Parasites Vectors* **8**:1–9 (2015a). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0671-2>.
- 55 Qualls WA, Müller GC, Traore SF, Traore MM, Arheart KL, Doumbia S *et al.*, Indoor use of attractive toxic sugar bait (ATSB) to effectively control malaria vectors in Mali, West Africa. *Malar J* **14**:301 (2015b). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0819-8>.
- 56 Saghaifpour A, Vatandoost H, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Jooshin MK *et al.*, Control of zoonotic cutaneous leishmaniasis vector, *Phlebotomus papatasi*, using attractive toxic sugar baits (ATSB). *PLoS ONE* **12**:1–14 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173558>.
- 57 Ferreira TN, Pita-Pereira D, Costa SG, Brazil RP, Moraes CS, Diaz-Albiter HM *et al.*, Transmission blocking sugar baits for the control of *Leishmania* development inside sand flies using environmentally friendly beta-glycosides and their aglycones. *Parasit Vectors* **11**:1–20 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3122-z>.
- 58 Coleman RE, Robert LL, Roberts LW, Glass JA, Seeley DC, Laughinghouse A *et al.*, Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* **30**:499–502 (1993). <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.3.499>.
- 59 Maciel MV, Moraes SM, Bevilacqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN *et al.*, Chemical composition of eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet Parasitol* **167**:1–7 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.053>.
- 60 Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Jahanifard E, Vatandoost H, Amin G, Moosavi L *et al.*, Repellency effect of Myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. *Iranian J Publ Health* **35**:7–13 (2006).
- 61 da Costa SG, Moraes CDS, Bates P, Dillon R and Genta FA, Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia longipalpis* in the absence of sugar feeding. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **114**:1–6 (2019b). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180482>.
- 62 Lawyer P, Killick-Kendrick M, Rowland T, Rowton E and Volf P, Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite* **24**:42 (2017). <https://doi.org/10.1051/parasite/2017041>.
- 63 Abrudan J, Ramalho-Ortigão M, O'Neil S, Stayback G, Wadsworth M, Bernard M *et al.*, The characterization of the *Phlebotomus papatasi* transcriptome. *Insect Mol Biol* **22**:211–232 (2013). <https://doi.org/10.1111/imb.12015>.
- 64 Nerio LS, Olivero-Verbel J and Stashenko E, Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol* **101**:372–378 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>.
- 65 CHEMSPIDER (2020) *Information About Pentamidine*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. Access on March 17th, 2021 and available in <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4573.html>
- 66 Kimutai A, Ngeiywa M, Mulaa M, Njagi PGN, Ingonga J, Nyamwamu LB *et al.*, Repellent effects of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Tagetes minuta* on the sandfly,

- Phlebotomus duboscqi. *BMC Res Notes* **10**:98 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2396-0>.
- 67 Moussa MA, Rutledge LC, Buescher MD, Wirtz RA and Glackin KB, Laboratory tests of repellents against *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae)1. *J Med Entomol* **19**:176–180 (2015). <https://doi.org/10.1093/jmedent/19.2.176>.
- 68 Munstermann LE, Phlebotomine sand flies and moth flies (Psychodidae), in *Medical and Veterinary Entomology*, Third edn. Academic Press, London, UK, pp. 191–211 (2019). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814043-7.00012-1>.
- 69 Guidobaldi F, May-Concha IJ and Guerenstein PG, Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J Physiol Paris* **108**:96–111 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.006>.
- 70 Gaglio G, Nali E, Arfuso F, Abbate JM, Giannetto S and Brianti E, Do different LED Colours influence sand Fly collection by light trap in the Mediterranean? *Biomed Res Int* **2018**:1–7 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/6432637>.
- 71 Mellor HE, Hamilton JGC and Anderson M, Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Med Vet Entomol* **10**:371–374 (1996). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00759.x>.
- 72 Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM and Almeida-Amaral EE, Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* **6**:e14666 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>.
- 73 Sreelatha T, Hymavathi A, Babu KS, Murthy JM, Pathipati UR and Rao JM, Synthesis and insect antifeedant activity of plumbagin derivatives with the amino acid moiety. *J Agric Food Chem* **57**: 6090–6094 (2009). <https://doi.org/10.1021/jf901760h>.

3.2. CAPÍTULO 2

Artigo Submetido ao periódico "Pest Management Science"

Título: "Age, sex and mating status discrimination in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* using Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS)"

Autores: Tainá Neves Ferreira, Lilha M. B. Santos, Vanessa Valladares, Gabriela A. Garcia, Catherine Flanley, Mary Ann McDowell, Clélia C. Mello-Silva, Rafael Maciel-de-Freitas, Fernando Ariel Genta

1

2 Age, sex and mating status discrimination in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* using
3 Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS)

4

5 Tainá Neves Ferreira¹, Lilha M. B. Santos², Vanessa Valladares³, Catherine
6 Flanley⁴, Mary Ann McDowell⁴, Gabriela A. Garcia², Clélia C. Mello-Silva³, Rafael
7 Maciel-de-Freitas^{2,5}, Fernando Ariel Genta^{1,5}

8

9 ¹Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz,
10 Rio de Janeiro, Brazil

11 ²Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz,
12 Rio de Janeiro, Brazil

13 ³Malacology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

14 ⁴Eck Institute for Global Health, Department of Biological Sciences, University of
15 Notre Dame, Notre Dame, IN, USA

16 ⁵Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de
17 Janeiro, Brazil

18 *Corresponding author Fernando Ariel Genta

19 genta@ioc.fiocruz.br or gentafernando@gmail.com

20 Tainá Neves Ferreira

21 fnevestaina@gmail.com

22 Lilha M. B. Santos

23 lilhaharbosa@gmail.com

24 Vanessa Valladares

25 Vanessavalladarescm@gmail.com

26 Catherine Flanley

27 cflanley@gmail.com

28 Mary Ann McDowell

29 mmcdowe1@nd.edu

30 Gabriela A. Garcia
31 gabiazambuja@hotmail.com
32 Clélia C. Mello-Silva
33 cleliachristinamellosilva@gmail.com
34 Rafael Maciel-de-Freitas
35 macieldefreitas@gmail.com
36

37 **Acknowledgements.** The authors are thankful to Bianca dos Santos Carvalho (IOC-
38 Fiocruz) and Dr. Samara Graciane da Costa Latgé (IOC-Fiocruz) for maintenance of the
39 sand fly colony. This work was funded by the Brazilian Research agencies FAPERJ,
40 CAPES, CNPq, and Fiocruz.

41

42 **1. Abstract**

43

44 Aiming a better control of vector-borne diseases, it is essential to understand aspects
45 related to the physiology and capacity of the vector. The sand fly *Lutzomyia*
46 *longipalpis* has great importance in medical entomology for disseminating
47 *Leishmania* parasites, the causative agent of Leishmaniasis, one of the main
48 neglected diseases listed by WHO. In this respect, it is necessary to evaluate the
49 transmission potential of this species as well as the success of vector control
50 interventions. Near-infrared spectroscopy (NIRS) has been used as a tool for age
51 estimation for mosquitoes in different conditions (laboratory, semi-field, and
52 conservation), taxonomic analysis, and infection detection. However, there are no
53 studies using NIRS for sand flies. In this study, we developed analytic models to
54 estimate the age of *L. longipalpis* adults under laboratory conditions, identify their
55 copulation state, and evaluate their gonotrophic cycle and diet. Sand flies were
56 classified with an accuracy of 58-82% in 3 age groups and 82-92% when separating
57 them into young (<8 days) or old (>8 days) insects. The classification between mated
58 and non-mated sandflies was 98-100% accurate, while the percentage of hits of
59 females that had already passed the first gonotrophic cycle was only 59%. We

60 consider the results of age and copula estimation very promising, as they provide
61 important aspects of vector capacity assessment which can be obtained quickly and
62 at a lower cost with NIRS.

63

64 **Declarations**

65 *Funding.* This work was funded by the Brazilian Research agencies FAPERJ, CAPES,
66 CNPq, and Fiocruz. TNF is a Ph.D. student of the Post-graduate Program in Parasite Biology
67 of the Oswaldo Cruz Institute. MAM, CCM, RM and FAG are staff members of their
68 respective departments.

69 *Conflicts of interest/Competing interests.* The authors have no relevant financial or non-
70 financial interests to disclose.

71 *Ethics approval.* All procedures relating to animals were approved by the Animal Research
72 Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC license number L-029/2016).

73 *Consent to participate.* Not applicable.

74 *Consent for publication.* Not applicable.

75 *Availability of data and material.* All data generated or analysed during this study are
76 included in this published article.

77 *Code availability.* Not applicable.

78

79 **Key Message**

80 Determining the age and mating status of adult dipterans sand flies may be important for the
81 critical assessment of vector control interventions. NIRS is a fast, low cost technique with
82 many advantages when compared to the traditional techniques that follow ovarian or cuticle
83 development, or pteridine content. In this work we show for the first time that NIRS may be
84 used for discrimination between young and old sand flies, and mated or non mated adult of
85 both sexes in the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis*.

86

87 **Author Contribution Statement**

88 TNF, MAM, CCM, RM and FAG conceived and designed the experiments. TNF, LMBS, VV,
89 CF, GAG conducted the experiments and analyzed the data. TNF and FAG wrote the initial
90 manuscript. All authors read and approved its final form.

91

92 **Keywords:** *Lutzomyia longipalpis*, NIRS, age, discriminant classification, sand fly,
93 *Leishmania*

94

95 **2. Introduction**

96

97 Leishmaniasis is a neglected disease and is reckoned as one of the most important
98 vector-borne diseases. It has a complex transmission cycle, that presents a diversity
99 of vectors, reservoirs, and parasites (OPAS 2019; WHO, 2022). Leishmaniasis is
100 present in all continents and is endemic in more than 100 countries. It is estimated
101 that around 350 million people live in places at risk of contracting the infection,
102 particularly in places with low social and economic development (Alvar et al. 2012;
103 Costa and Souza 2018; OPAS 2019; WHO¹, 2022).

104 Sand flies (*Psychodidae* Family, *Phlebotominae* Subfamily) are vectors of the
105 parasites in the genus *Leishmania*, transmitted through the female bite during the
106 blood meal. These hematophagous dipterans are widely distributed in the world,
107 particularly in tropical and sub-tropical regions (Costa and Souza 2018; OPAS 2019;
108 WHO 2022).

109 There are several genera among phlebotomine sand flies, but *Lutzomyia* and
110 *Phlebotomus* are the most significant in terms of vector capacity (Killick-Kendrick
111 1999; OPAS 2019; Ready 2013). In the Americas, *Lutzomyia longipalpis* is one of
112 the most important species, being responsible for the development and transmission
113 of *Leishmania infantum*, the parasite that causes visceral leishmaniasis (Brasil 2014,
114 2017; OPAS 2019).

115 In arthropod vector-borne diseases, the pathogens need time to develop and
116 replicate inside the vector, and reach their infective form. This time is named
117 Extrinsic Incubation Period (EIP) (Resh and Cardé 2009). Females of *Lutzomyia*
118 *longipalpis*, for example, need to live at least 7-9 days to be able to transmit these
119 parasites. They need to make a first infective blood-feeding, which can happens only
120 at 1-2 days after emergence, due to the time needed for the development of the oral
121 apparatus. Following that, the development of the metacyclic forms of *Leishmania*
122 *infantum* is completed at 6-7 days post-feeding. Then, the parasites may be
123 transmitted in a second or multiple blood-feeding, closing a transmission cycle
124 (Kamhawi 2006; Serafim et al. 2018). The parameters EIP and longevity compose a
125 mathematical model that evaluates the vectorial capacity of the insect (Resh and
126 Cardé 2009).

127 In this context, knowledge about the age of the insects is essential to measure the
128 impact of vector control strategies, such as the use of chemical insecticides or the
129 use of attractive toxic sugar baits (ATSBs) interventions (Fraser et al. 2021; Lehane
130 1985). For sand flies, this assessment is usually done by capture-mark-release
131 (Galati et al. 2009). However, this methodology provides primarily the density of
132 population, and may be influenced by environmental changes.

133 The classic techniques for the determination of age of insects are analysis of
134 cuticular growth, ovarian development, and quantification of pteridines (Amendt,
135 Bugelli, and Bernhardt 2021; Lehane 1985; Vogt and Walker 1987). In the evaluation
136 of ovaries, it is necessary to do the dissection of each insect to infer whether a female
137 has laid eggs (parous) or not (nulliparous) (Detinova, 1962; Amendt, Bugelli, and
138 Bernhardt 2021). Nevertheless, these techniques tend to be laborious, demanding
139 time and specialized personnel to be carried out. These techniques are considered
140 accurate and efficient. However, it has not been possible to analyze the necessary
141 number of samples to evaluate the effectiveness of an intervention based on the age
142 of sand fly populations (Johnson and Naiker 2019; Kather and Martin 2012; Kelly
143 Liebman, Isabel Swamidoss, Lucrecia Vizcaino, Audrey Lenhart, Floyd Dowell
144 2015).

145 In recent times, alternative methods for age-grading have been developed based on
146 the cuticular hydrocarbons (Amendt et al. 2021), near-infrared reflectance
147 spectroscopy (NIRS) (Mayagaya et al. 2009; Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016; Sikulu
148 et al. 2010), and transcriptional profiles (gene biomarkers) (Caragata et al. 2011;
149 Cook and Sinkins 2010; Hugo et al. 2010). In this sense, the use of near-infrared
150 spectroscopy (NIRS) has been considered a viable and efficient alternative with high
151 precision, fast results, and low cost, to estimate the age of different orders of insects
152 (Aw et al. 2012; Lambert et al. 2018; Milali et al. 2019; Reeves et al. 2010; Sikulu et
153 al. 2010).

154 Near-infrared spectroscopy provides us with information on the interaction of
155 radiation with matter (atoms and molecules). When the infrared radiation is
156 absorbed, it produces vibrational transitions depending on the molecules present in
157 the sample, mainly biological materials. This information creates spectral profiles
158 (overtones) according to the internal and external biochemical composition of the
159 organism (Amendt et al. 2021; Capuano and Ruth 2016; Mayagaya et al. 2009;
160 Subramanian, Prabhakar, and Ohio 2016).

161 The cuticle of insects is composed of organic compounds such as esters, ketones,
162 alcohols, sterols, and mainly hydrocarbons (Gibbs 1995). These molecules form a
163 lipid layer to protect insects from dehydration and abrasion. Importantly, these
164 biological materials containing bonds like $-CH$, $-OH$, $-SH$, and $-NH$ present
165 rotation, elongation, and bending, that are detected by light in the range from 350
166 nm to 2500 nm (Aw et al. 2012; Foley et al. 1998; Pasquini 2018; Roggo et al. 2007).

167 In this respect, NIRS can detect physiological changes in the insect and has been
168 successfully used in different arthropods, with diverse aims as determining cryptic
169 species, infection, type of diet, or physiological state (Depickère, Ravelo-García, and
170 Lardeux 2020; Kinzner et al. 2015; Mayagaya et al. 2009; Lilha M. B. Santos et al.
171 2021; Siegwart et al. 2015; Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016; Sikulu et al. 2010; Tátilla-
172 Ferreira et al. 2021).

173 This technique also had good results in different applications in vectors species like
174 mosquitoes (Esperança et al. 2018; Lambert et al. 2018; Milali et al. 2019; Lilha M.

175 B. Santos et al. 2021; Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016; Sikulu-Lord et al. 2018; Sikulu
176 et al. 2010, 2011), kissing bugs (Depickère et al. 2020; Tátila-Ferreira et al. 2021),
177 culicoids (Reeves et al. 2010), snails (Valladares et al. 2021), and in agricultural
178 pests (Johnson 2020; Santos et al. 2019). Nevertheless, there are no studies with
179 leishmaniasis vectors. In the last years, studies have used NIRS analysis to correctly
180 classify young (<7 days) and old (> 7 days) *Anopheles* spp (Sikulu et al. 2010) with
181 high accuracy (78–89% and 73.5–97%, respectively). In other work, the same
182 authors also obtained excellent results for the classification of young (<7 days) and
183 old (> 7 days) colonized mosquitoes from the wild (Krajacich et al. 2017) or in *A.*
184 *aegypti* wild-Type and *Wolbachia* infected (Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016). Liebman
185 et al. (2015) verified whether varied diets would influence age prediction using NIRS
186 and they had 71-90% of correct predictions classifying *A. aegypti* into young *versus*
187 old females.

188 Thus, in this work, we investigated NIRS in several aspects related to the physiology
189 of sand flies: longevity estimative, copula state, gonotrophic cycle and diet, with the
190 aim of increasing the information about NIRS as an effective tool to evaluate
191 interventions for the control of sand flies.

192192

193 **3. Material and Methods**

194194

195 **Insects**

196196

197 All sand flies, *Lutzomyia longipalpis*, used in this study were reared in laboratory
198 conditions (temperature of 26°C ±2 °C and relative humidity of ≥ 70%) and this
199 population originally came from Jacobina, Bahia, Brazil. The adults, after the
200 emergence from the pupae, were kept in cubic tissue cages with approximately 25
201 cm on each side. For routine rearing, adult sand flies were fed with 70% (w/v)
202 autoclaved sucrose solution in cotton wool. For blood-feeding and oviposition,
203 females were fed on golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) anesthetized with

204 xylazine (10 mg/kg) plus ketamine (200 mg/kg) or fed on rabbit blood (*Oryctolagus*
205 *cuniculus*) in an artificial system (Hemotek) using chick skin as a membrane (da
206 Costa et al. 2019; Moraes et al. 2018; Ferreira et al. 2022).

207207

208 **Near-Infrared Spectrophotometry scanning**

209 Sand flies were scanned immediately after being anesthetized with ethyl acetate.
210 They were placed on a plate (spectralon) to be scanned individually. Each insect
211 was positioned laterally under the NIR probe, taking the head and thorax region, and
212 scanning an area of around 2 mm. This process was done with a Labspec 4i NIRS
213 spectrometer (Malvern Panalytical, Longmont, CO) containing an external 3.2 mm
214 diameter fiber optic probe and an 18,6 W light source (Model 135325 Rev B, ASD
215 Inc.), according to previous works published (Mayagaya et al. 2009; Santos et al.
216 2021). The ASD software RS³ version 3.1 was used to collect all spectra taking
217 around 5s per sample collected.

218 In supplementary figure 1, we can see a typical spectra Log 1/R (Absorbance) vs
219 wavelength (nm) obtained for adults of *L. longipalpis*.

220 All insects were previously fed with sucrose solution and anesthetized for spectra
221 collection on different days post-emergence, according to the experimental scheme.

222

223 **Samples**

224 **Longevity analysis**

225 Adult sand flies males and females newly emerged (0-1 day) were confined in
226 different cubic tissue cages. These Insects were removed to scan in the NIR probe
227 on different days post-emergence: 1 (0-1-day-old), 3, 8, 10, 15, and 17. These sand
228 flies were kept separate and did not have the opportunity to copulate, and this
229 protocol was repeated 4 times to obtain at least 40 spectra for each age. This
230 analysis was repeated by taking together young sand flies (1 and 3 days), middle (8
231 and 10 days), and old (15 and 17). A new classification was done considering only

232 two groups: young sand flies \leq 8d (1, 3, and 8 days) versus $>$ 8d (10, 15, and 17
233 days). Table 1 presents the number of sand flies scanned and used in calibration
234 and classification.

235 A similar procedure was made with adults sand flies newly emerged, however, this
236 time both sexes were kept in the same cage and had the chance to copulate. In this
237 assay, insects were scanned on days: 1, 8, and 15 days post-emergence, and this
238 procedure was made in triplicate. Table 2 (part A) presents the number of sand flies
239 scanned and used in calibration and classification. In a second classification, we
240 consider only young sand flies $<$ 8d (1 day) versus $>$ 8d (15 days) (Table 2 – part B).

241241

242242

243243

244 **Copulation status**

245 The samples of sand flies were analyzed comparatively to verify the
246 similarity between sand flies coupled and not copulated. For this, we analyzed
247 samples of males and females only 8 days post-emergence and the spectra were
248 the same obtained in the previous description. Table 3 informs the number of sand
249 flies used in the two analyses following the same procedure described previously.

249250

250251

251252

252253

253 **Gonotrophic cycle**

254 Sand flies were confined in two different cubic tissue cages with 85-100 females
255 newly emerged (0-1 day) and fed with sucrose solution. Three days later a group of
256 females was fed with blood in an artificial system (item 3.1) and 2-3 days after that
257 all engorged females were put in plastic pots with a plaster layer for oviposition. After

258 three days, when these females completed 9-10 days post-emergence and after
259 laying their eggs, they were anesthetized and scanned in their NIR wavelength
260 region. This experiment was made in triplicate.

261 For the construction of the model we scanned only females without visible eggs in
262 their ovaries. Those females that still had unlaied eggs were used only for prediction
263 (classification). The number of females used in the analysis will be present in results,
264 highlighting that the second analysis (right part) was done by removing the females
265 with eggs not laid independently of their rank.

266267

267268

268 **Chemometric Analyses**

269 The chemometric analyses were made in the Unscrambler R software (version
270 10.5.1). Each spectrum was pre-processed to decrease possible noise (Smoothing
271 Savitzky-Golay – 2nd polynomial order / 31 points and 1st derivative Savitzky-Golay
272 - 2nd polynomial order / 15 points) to minimize the possible influence on results. A
273 specific spectral model was created for each cluster of samples before their
274 validation. The exploratory method used for the analyses was Principal Components
275 Analysis (PCA) to validate the belonging of samples to distinct groups that
276 corresponded to the different conditions (age, copula, and gonotrophic cycle)
277 (Figures 1,2,5,6, 9-ac, and 10-ac). Samples classified as outliers were identified and
278 removed using Hotelling T² statistics, considering a 95% confidence interval ellipse
279 according to previous studies (Ong et al. 2020), and then a new PCA was
280 recalculated without outliers.

281 The next step was the classification of the results using a Linear Discriminant
282 Analysis (LDA), a tool that linearly describes the main characteristics through the
283 categorized information, ordering the samples in a certain group. The results are
284 summarized in tables containing the number of spectra used in the validation,
285 classification, the percentage of correct classifications (hits), and the accuracy of the

286 LDA (Figures 3, 4, 7, 8, 9-bd, and 10-bd). These procedures are according to
287 Valladares et al. (2021).

288 **4. Results**

289 This work explored NIRS in different parameters of sand flies' physiology: longevity,
290 copulation, and gonotrophic cycle. The results of longevity in adults separated by
291 sex with 6 age status (1, 3, 8, 10, 15, and 17 days after emergence) (Figures 1a and
292 2a) presented us with an accuracy of 50 and 62% for males and females, respectively
293 (Table 1 – part A; Figures 3a and 4a). The highest percentages of hits were 73%
294 and 76% to 1 day (males and females), 100% to 8 days (females), and 60% to 17
295 days (males and females) (Table 1 – part A). For the other ages, the hits were less
296 than 60%. In general, females present scores better than males (Table 1 – part A;
297 Figure 3a and 4a).

298 When insects were separated as a young, middle, and old (Figure 1b and 2b) the
299 female's accuracy (Figures 3b) (73%) and hits within 1-3 days and 8-10 days have
300 better percentages, up to 78%, except to for 8-10 days males (17%) (Table 1– part B).
301 We can see a group more defined in samples of 1 day in both sexes (Figures 1b and
302 2b). In males, the accuracy did not have a significant improvement (Table 1 – part B
303 and Figure 4b). The correct rating was also low, 44 and 42%, for 15-17 days for
304 males and females (Table 1 – part B).

305306

306307

307 **Table 1:** Classification of the hits of sand flies adults (*Lutzomyia longipalpis*) of
 308 different ages separated by gender, based on a Linear Discriminant Analysis (LDA)

A	Females				Males			
Age (days)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)
1	20	41	76%	62%	27	17	73%	50%
3	20	7	29%		40	52	56%	
8	20	13	100%		20	9	22%	
10	20	19	21%		20	14	50%	
15	20	14	7%		8	4	40%	
17	6	5	60%		10	5	60%	
Total	106	99			125	101		
B	Females				Males			
Age (days)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)
1-3	40	48	85%	73%	67	69	80%	58%
8-10	40	32	78%		40	23	17%	
15-17	26	19	42%		18	9	44%	
Total	106	99			125	101		
C	Females				Males			
Age (days)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)
< 8	40	49	83%	87%	68	75	87%	86%
≥ 8	65	51	85%		47	36	92%	
Total	105	100			115	111		

309310

310311

311 Grouping the insects into 2 classes, < 8 or ≥ 8 days (young or old) resulted in
 312 predictions above 83% (Table 1 – part C) and this categorization could be observed
 313 also in the PCA for females and males (Figures 1c and 2c). In this condition, the
 314 accuracy is higher than 85% for both sexes (Figure 3 and 4).

315 Figures 5-6 and Table 2 present the results of the classification in different ages of
 316 sand flies that were kept together in the same cage, so they had opportunity to mate.
 317 Except for the 8-day-old insects (67 - 58 %), the other ages had correct predictions
 318 above 74% (Table 2 –part A). The accuracy of LDA was 82% for males and 75% for
 319 females (Table 2 - part A, Figures 7b and 8b).

320321

321 **Table 2:** Classification of the hits of sand flies adults (*Lutzomyia longipalpis*) in
 322 different ages maintained together, based on a Linear Discriminant Analysis (LDA)

323324

324325

A	Females				Males			
Age (days)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)
1	50	62	80%	75%	50	34	74%	82%
8	50	91	58%		60	48	67%	
15	50	54	87%		34	30	87%	
Total	150	207			144	112		
B	Females				Males			
Age (days)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy (LDA)
< 8	50	62	97%	91%	40	44	80%	92%
> 8	45	59	93%		35	29	93%	
Total	95	121			75	73		

325326

326327

327 By taking out the middle-aged sand flies and keeping only young *versus* old, we had
 328 an improvement in the results of correct classification, being between 80-97% (Table
 329 2 – part B). The separation of the groups could be perceived in Figures 5b and 6b in
 330 PCA analyses, as well the accuracy staying between 91-92% (Table 2 - part B;
 331 Figures 7 and 8).

332 To verify if we could combine the spectra of mated and unmated insects in the age
 333 estimative, we compared these samples to each other at the same age (8 days)
 334 (Table 3). PCA and LDA analyses were performed twice increasing the number of
 335 samples (Table 3 - part B). The result was very similar (Table 3) with accuracy >
 336 98% and correct previsions among 82- 100%. Figure 9 shows us a clear partition
 337 between samples using less samples (a and b) or more (c and d).

338 **Table 3:** Classification of the hits of sand flies adults (*Lutzomyia longipalpis*)
 339 copulated or not, based on a Linear Discriminant Analysis (LDA)

	Females				Males			
Status	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy
NC	20	13	92%	100%	20	9	100%	100%
COP	20	25	100%		20	24	100%	
Total	40	38			40	33		
	Females				Males			
Status	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy
NC	22	11	82%	99%	23	12	100%	98%
COP	45	44	98%		40	44	100%	
Total	67	55			63	56		

340 NC: not copulated and COP.: copulated

341342

342343

343 Another aspect related to the physiology of sand flies investigated was the
344 gonotrophic cycle. We tested if NIRS can categorize females fed only with sucrose
345 solution or sucrose solution and blood, post laying eggs. The correct classification
346 for the sucrose group was only 43%, while sucrose plus blood was 59% (Table 4).
347 The same result in hits and accuracy (61% - Figures 10) was found taking out
348 females with eggs unlaidd in predictions (Table 4 – right). In Figure 10 we can see a
349 mixture of the different samples in PCA and LDA.

350351

351 **Table 4:** Classification of the hits of sand flies females (*Lutzomyia longipalpis*) fed
352 on sugar solution or sugar plus blood based on a Linear Discriminant Analysis (LDA)

Status	Females				Females			
	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy	Model (n)	Validation (n)	Hits	Accuracy
Suc	60	143	43%	61%	60	143	43%	61%
Suc_B	60	150	59%		60	87	59%	
Total	120	293			120	230		

354 Suc: Sucrose solution and Suc_B.: sucrose solution plus blood fed

355

356 5. Discussion

357 The results present in this work suggest that the NIR spectroscopy was capable to
358 discriminate sand flies of different ages, mate status, and gonotrophic cycle for
359 females. This tool has been used to estimate the age of other dipterans (Aw et al.
360 2012; Lilha M.B. Santos et al. 2021; Sikulu-Lord, Maia, et al. 2016; Sikulu et al. 2010)
361 but had not been applied before to leishmaniasis vectors.

362 The spectra collected demonstrated differences in chemical phenotypes that are
363 putatively related to the metabolic arrangement observed in the diverse physiological
364 conditions tested. In general, the main peaks observed at 1450, 1800, and 1930 nm
365 are associated with peaks of water absorption (Supplementary figure 1). In studies
366 with other insects such as mosquitoes and beetles (Aw and Ballard 2019;
367 Fischnaller et al. 2012; Perez-mendoza et al. 2004) the peak at 1820 nm is attributed
368 to the 1st overtone of C–H stretching and the peak at 1900 nm corresponds to the
369 absorption of COOC functional groups, which is due to the lipid composition of the
370 cuticle of these insects.

371 Younger sand flies seem to have a higher body water content compared to the older
372 ones, demonstrating that water could influence age grading in insects (Mayagaya et
373 al. 2009; Ong et al. 2020). This was observed when we scan sand flies kept on silica
374 for more than 7 days, since the spectra lose this characteristic shape, staying without
375 or with lower peaks (data not shown).

376 One of the main aims of this study was to estimate the age of sand flies, which is an
377 important topic in vector control. Through this data, it is possible to assess impacts
378 on the transmission cycle since the pathogens have an incubation period in the
379 vector before reaching their infective forms (Krajacich et al. 2017; Mayagaya et al.
380 2009). Females of *Lutzomyia longipalpis*, for example, need to complete at least 7-
381 9 days to be able to develop the metacyclic forms of *L. infantum* and disseminate
382 them in a second blood-feeding (Kamhawi 2006; Serafim et al. 2018).

383 The results of age grading using insects separated by sex and six different ages had
384 a low ratio of correct predictions, but this was improved when we separated the
385 samples in three (young, middle, old) or two (young or old) groups, with correct
386 predictions > 83%. Similar results were found in the literature with *Anopheles* spp
387 (Mayagaya et al. 2009; Sikulu et al. 2010), *Aedes* spp (Sikulu-Lord et al. 2018;
388 Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016) culicoides (Reeves et al. 2010), and *Drosophila* spp.
389 (Aw et al. 2012).

390 Previous works also had problems for the correct classification of ages between 10-
391 16 days old, similarly to our results for 10 and 15 days old females (Table 1 – part
392 A) and males (Table 1 – part A and B). This suggests that the functional groups
393 measured mainly in 1450, 1800, and 1930 nm decreased with the age of the
394 sandflies (Liebman et al. 2015). It is possible that biochemical and structural changes
395 in insects, detectable by NIRS, only occur when age differences are > 7 days
396 (Mayagaya et al. 2009), which agrees with the findings for the flesh fly, *Sarcophaga*
397 *bullata*, in the analysis of cuticular HC composition (Amendt et al. 2021).

398 It is worth mentioning that sand flies are more fragile when compared to mosquitoes,
399 and that is difficult to collect them in high numbers due to mortality in older insects.
400 This was especially critical for getting flies older than 10 days, since their average
401 life span is 15 days (Ferreira et al. 2018). Though, if we consider 8 days as the limit
402 to assess the vector's capacity to spread *Leishmania*, the low ability of NIRS to
403 discriminate between insects with 3 or 10 days old may not be problematic for
404 epidemiological considerations.

405 In Mayagaya (Mayagaya et al. 2009) the authors achieve 80% of correct predictions
406 for females when separated them in two groups, new versus old. They also mention
407 the difficulty for separating younger mosquitoes with few days of difference (e.g., 1
408 day old *versus* 3 or 7-days), which is consistent with our results for 3 day old sand
409 flies (Table 1 – part A). In addition, in this reference, the authors had an accuracy
410 for males of only 50%, which is also in accord to our results when we analyzed 6
411 different age groups (Table 1 – parts A and B), as we had better hits and accuracy
412 for females than for males. A similar result was also observed in *Drosophila* spp (Aw
413 et al. 2012).

414 In general, we observed lower accuracy and hits in males when compared to females
415 (Tables 1 and 2). This fact may be attributed to the small body size of males that
416 may result in a lower capture of structural information by infrared spectroscopy. This
417 may affects physiological information either, for example, males ingest a smaller
418 amount of sugar solution when compared to females (13.1 ± 1.5 vs 20.4 ± 1.9 nL)

419 (Ferreira et al. 2018). Another explanation may be due to lesser changes in the males'
420 cuticle than in the females' ones, which may suffer physiological modifications
421 related to blood feeding and oogenesis (Mayagaya et al. 2009).

422 An improvement in the results of age determination was also observed when mated
423 insects were classified only in 2 groups (young vs old), when compared to unmated
424 ones (Table 2 – Figures 5-8). This suggests that mated sand flies can provide more
425 information related to their chemical composition or structural organization. Besides
426 that, using mated insects brings more robustness to the technique, since this would
427 be closer to the conditions in the field.

428 Literature data comparing the age of dipterans in different conditions (wild
429 populations and infection status) (Sikulu-Lord, Milali, et al. 2016), preservation
430 protocols (Sikulu-Lord et al. 2018; Sikulu et al. 2011), and exposure to insecticides
431 (Sikulu et al. 2014) showed that even under different settings it is possible to achieve
432 accuracy values and correct predictions above 80%.

433 The estimate of age in insects is a complicated process and depends on diverse
434 features. Modifications that occurred in the cuticle, in surface lipids, muscle tissue,
435 fat body, in the reproductive or digestive systems, and other biochemical changes
436 may influence the absorbance of the spectra and all this will be detected by NIRS
437 (Perez-mendoza et al. 2004).

438 Overall, our results are promising compared to previous prediction techniques such
439 as ovarian dissection, assessment of pteridine accumulation, cuticular
440 hydrocarbons, or assessment of transcriptional profiles, since these techniques
441 require more time and cost as reported by other authors (Mayagaya et al. 2009).

442 Interestingly, NIR spectroscopy was very efficient in the classification of mated or
443 unmated sand flies since we have accuracies greater than 98% even in a lower
444 number of samples (Table 3). The figure shows us a clear separation between
445 samples in PCA and LDA. This data propose that the copula causes many changes
446 in the physiology of different parts of the body of sand flies, or that for some reason

447 the scanning probe was positioned more precisely on the head and thorax. A
448 possible explanation for a high differentiation between the groups in females is
449 because the mated females are fertilized and in a pre-oviposition state, waiting for
450 an opportunity to take a blood meal and continue the development and egg-laying.

451 According to Detinova (1968), a high proportion of parous females (those who have
452 already produced offspring) in an area of adult control measures, for example,
453 indicates that the treatment has not been adequate. On the other hand, in an area
454 with larval control measures, if the proportion of nulliparous females (those who have
455 not produced offspring) is high, this signals that the reproduction process remains
456 constant, generating new individuals, and hence the unsuccessfulness of control
457 measures applied to immature stages. Besides that, this kind of data has great
458 relevance in endemic areas, since it provides an estimate of the density of the
459 population of mated females that will look for a vertebrate host for blood-feeding.

460 Surprisingly, our results about the difference in the type of meal (sugar vs blood) and
461 gonotrophic cycle had very low ratio of correct predictions and accuracy, especially
462 on females that fed only in sugar solution. Mayagaya *et al.* (2009) compared unfed,
463 fed, and gravid females of mosquitoes, and the data they found for gravid was only
464 65% correctly classified, such as our result. That differs from the results obtained
465 using NIRS in *A. aegypti* by Hall *et al.* (Hall, Dutro, and Klowden, 1990) to measure
466 the volume of blood ingested by mosquitoes. These low accuracies suggest that the
467 age of those females (9-10 days) may be affecting the spectra, possibly due to
468 dehydration already related in older insects (Perez-mendoza *et al.* 2004). Moreover,
469 it was possible to observe the loss of quality of spectra in older sand flies, mainly >
470 15 days during the collection of the sand flies for the longevity tests (data not shown).

471 Liebman *et al.* (2015) also found a low ratio of correct predictions (66.7 %) for females
472 of *A. aegypti* that only fed on sugar solution. These authors considered that the
473 nutritional factor was influencing in the size of the mosquitoes and in the quality of
474 analysis. So, our data may have been affected by age and diet, since 10-day-old
475 females had already made oviposition and were able to take a second blood-feeding.

476 Another possible explanation for the low prediction results may be the absence of
477 variability in samples. Some authors emphasize the importance of external
478 validation, wild samples, to ensure better calibration models, in other words, a model
479 should be more widespread to consider the particularities of each sample (Krajacich
480 et al. 2017).

481 In this work we demonstrated some different possibilities of application of the NIRS
482 technique in sand flies. We had promising results for the estimate of age of sand
483 flies in laboratory conditions, especially in the classification of young (< 8d)
484 and old (> 8d) insects, a data with clear epidemiological relevance. This information
485 may be the basis for further studies of longevity in field
486 populations, and better evaluations of vector control strategies. Extending this
487 technique to field populations is necessary for the development of calibration models
488 that include sand flies with variable nutritional and background conditions. Besides
489 that, we also saw that the technique was very sensitive in separating mated from not
490 mated insects, and experimental adjustments are necessary to better classify
491 females through the gonotrophic cycle and type of feeding.

492492

493 **6. Conclusions**

494 This is the first time NIRS was used for characterizations of sand fly individuals.
495 NIRS can be used for discriminate between young (< 8 days old) and old (> 8 days
496 old) adult *L.longipalpis* sand flies. Besides that, NIRS can also be used for
497 determining the copulation status of both sexes (mated vs non mated). The
498 technique may be used in the future for studies of age structure of field populations
499 and assessment of the impact of vector control strategies, aiming the shortening of
500 life span or lowering of reproductive fitness. These features are critical for the
501 vectorial capacity of sand flies and need to be considered in the design of strategies
502 for blocking the transmission of *Leishmania* parasites.

503503

504 **7. Figure Legends**

505 **Figure 1** – Principal Components Analysis (PCA) of unmated females of *Lutzomyia*
506 *longipalpis* in different ages (a) 1-3-8-10-15-17-days-old, (b) 1-8-15-days-old, and
507 (c) < 8 or ≥ 8 days-old.

508 **Figure 2** – Principal Components Analysis (PCA) of unmated males of *Lutzomyia*
509 *longipalpis* in different ages (a) 1-3-8-10-15-17-days-old, (b) 1-8-15-days-old, and
510 (c) < 8 or ≥ 8 days-old.

511 **Figure 3** – Linear Discriminant analysis (LDA) of unmated females of *Lutzomyia*
512 *longipalpis* in different ages (a) 1-3-8-10-15-17-days-old, (b) 1-8-15-days-old, and
513 (c) < 8 or ≥ 8 days-old.

514 **Figure 4** – Linear Discriminant analysis (LDA) of unmated males of *Lutzomyia*
515 *longipalpis* in different ages (a) 1-3-8-10-15-17-days-old, (b) 1-8-15-days-old, and
516 (c) < 8 or ≥ 8 days-old.

517 **Figure 5** – Principal Components Analysis (PCA) of mated females of *Lutzomyia*
518 *longipalpis* at different ages (a) 1-8-15-days-old, and (b) < 8 or > 8 days-old.

519 **Figure 6** – Principal Components Analysis (PCA) of mated males of *Lutzomyia*
520 *longipalpis* at different ages (a) 1-8-15-days-old, and (b) < 8 or > 8 days-old.

521 **Figure 7** – Linear Discriminant analysis (LDA) of mated females of *Lutzomyia*
522 *longipalpis* at different ages (a) 1-8-15-days-old, and (b) < 8 or > 8 days-old.

523 **Figure 8** – Linear Discriminant analysis (LDA) of mated males of *Lutzomyia*
524 *longipalpis* at different ages (a) 1-8-15-days-old, and (b) < 8 or > 8 days-old.

525 **Figure 9** – Principal Components Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis
526 (LDA) of mated vs unmated females of *Lutzomyia longipalpis* (a,b) and mated vs
527 unmated males of *Lutzomyia longipalpis*.

528 **Figure 10** – Principal Components Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis
529 (LDA) of females fed on sucrose solution or sucrose plus blood. (a) (b) are results
530 keeping females with eggs unlaidd, and (c) (d) are results without females with eggs
531 unlaidd.

532 **Supplementary Figure 1** – Examples of spectra for sand flies (*L. longipalpis*):
533 Absorbance (Log 1/R - x axis) versus wavelength (nanometers - y axis).

534534

535535

536536

537 **8. REFERENCES**

- 538 Alvar, Jorge, Iván D. Vélez, Caryn Bern, Mercé Herrero, Philippe Desjeux, Jorge
539 Cano, Jean Jannin, and Margrieten de Boer. 2012. "Leishmaniasis Worldwide
540 and Global Estimates of Its Incidence." *PLoS ONE*.
- 541 Amendt, Jens, Valentina Bugelli, and Victoria Bernhardt. 2021. "Time Flies—Age
542 Grading of Adult Flies for the Estimation of the Post-Mortem Interval."
543 *Diagnostics* 11(2):152.
- 544 Aw, Wen C. and John William O. Ballard. 2019. "Near-Infrared Spectroscopy for
545 Metabolite Quantification and Species Identification." *Ecology and Evolution*
546 9(3):1336–43.
- 547 Aw, Wen C., Floyd E. Dowell, J. William, O. Ballard, and J. William O. Ballard.
548 2012. "Using Near-Infrared Spectroscopy to Resolve the Species , Gender ,
549 Age , and the Presence of Wolbachia Infection in Laboratory-Reared
550 *Drosophila*." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 2(September):1057–65.
- 551 Brasil. 2014. *Manual de Vigilância e Controle Da Leishmaniose Visceral*. 1ª edição.
552 edited by M. DA SAÚDE.
- 553 Brasil, Ministério da Saúde. 2017. "Leishmaniose Visceral 2016."

- 554 Capuano, E. and S. M. Van Ruth. 2016. *Infrared Spectroscopy : Applications*. 1st
555 ed. Elsevier Ltd.
- 556 Caragata, EP, P. H. Johnson, Y. S. Leong, S. A. Ritchie, S. L. O. Neill, and E. A.
557 Mcgraw. 2011. "Improved Accuracy of the Transcriptional Profiling Method of
558 Age Grading in *Aedes Aegypti* Mosquitoes under Laboratory and Semi-Field
559 Cage Conditions and in the Presence of *Wolbachia* Infection." 20(November
560 2010):215–24.
- 561 Cook, P. E. and S. P. Sinkins. 2010. "Transcriptional Profiling of *Anopheles*
562 *Gambiae* Mosquitoes for Adult Age Estimation." *Insect Molecular Biology*
563 19(6):745–51.
- 564 da Costa, Samara G., Paul Bates, Rod Dillon, and Fernando Ariel Genta. 2019.
565 "Characterization of α -Glucosidases From *Lutzomyia Longipalpis* Reveals
566 Independent Hydrolysis Systems for Plant or Blood Sugars." *Frontiers in*
567 *Physiology* 10(April):1–15.
- 568 Costa, Wagner Alexandre and Nataly A. Souza. 2018. "Sand Flies : Medical
569 Importance." *Springer Nature* 1–8.
- 570 Depickère, Stéphanie, Antonio G. Ravelo-García, and Frédéric Lardeux. 2020.
571 "Chagas Disease Vectors Identification Using Visible and Near-Infrared
572 Spectroscopy." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*
573 197:103914.
- 574 Detinova TS. 1968. Age Structure of Insect Populations of Medical Importance.
575 *Ann. Rev. Entomol.* 13: 427-450.
- 576 Esperança, Pedro M., Andrew M. Blagborough, Dari F. Da, Floyd E. Dowell, and
577 Thomas S. Churcher. 2018. "Detection of *Plasmodium Berghei* Infected
578 *Anopheles Stephensi* Using Near-Infrared Spectroscopy." *BioRxiv*.
- 579 Ferreira, Tainá Neves, Daniela Pita-Pereira, Samara Graciane Costa, Reginaldo
580 Peçanha Brazil, Caroline Silva Moraes, Hector Manuel Díaz-Albiter, and
581 Fernando Ariel Genta. 2018. "Transmission Blocking Sugar Baits for the

- 582 Control of Leishmania Development inside Sand Flies Using Environmentally
583 Friendly Beta-Glycosides and Their Aglycones." *Parasites and Vectors*
584 11(1):1–20.
- 585 Fischnaller, Stefanie, Floyd E. Dowell, Alexandra Lusser, Birgit C. Schlick-Steiner,
586 and Florian M. Steiner. 2012. "Non-Destructive Species Identification of
587 *Drosophila Obscura* and *d. Subobscura* (Diptera) Using near-Infrared
588 Spectroscopy." *Fly* 6(4):284–89.
- 589 Foley, W. J., a McIlwee, I. Lawler, L. Aragonés, a P. Woolnough, and N. Berding.
590 1998. "Ecological Applications of near Infrared Reflectance Spectroscopy a
591 Tool for Rapid, Cost-Effective Prediction of the Composition of Plant and
592 Animal Tissues and Aspects of Animal Performance." *Oecologia* 116(3):293–
593 305.
- 594 Fraser, Keith J., Lazaro Mwandigha, Sekou F. Traore, Mohamed M. Traore,
595 Seydou Doumbia, Amy Junnila, Edita Revay, John C. Beier, John M. Marshall,
596 Azra C. Ghani, and Gunter Müller. 2021. "Estimating the Potential Impact of
597 Attractive Targeted Sugar Baits (ATSBs) as a New Vector Control Tool for
598 *Plasmodium Falciparum* Malaria." *Malaria Journal* 20(1):1–14.
- 599 Galati, Eunice A. B., Mauro Breviglieri Fonseca, Ana Maria Marassá, and Edna
600 Fátima M. Bueno. 2009. "Dispersal and Survival of *Nyssomyia Intermedia* and
601 *Nyssomyia Neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a Cutaneous
602 Leishmaniasis Endemic Area of the Speleological Province of the Ribeira
603 Valley, State of São Paulo, Brazil." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*
604 104(8):1148–58.
- 605 Hall, MH, SM Dutro, and MJ Klowden. 1990. "Determination by Near-Infrared
606 Reflectance Spectroscopy of Mosquito (Diptera : Culicidae) Bloodmeal Size .
607 PubMed Commons." *J Med Entomol* 27(1):76–79.
- 608 Hugo, Leon E., Peter E. Cook, Petrina H. Johnson, Luke P. Rapley, Brian H. Kay,
609 Peter A. Ryan, Scott A. Ritchie, and Scott L. O. Neill. 2010. "Field Validation of
610 a Transcriptional Assay for the Prediction of Age of Uncaged *Aedes Aegypti*

611 Mosquitoes in Northern Australia." 4(2).

612 Johnson, Joel B. 2020. "An Overview of Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) for the
613 Detection of Insect Pests in Stored Grains." *Journal of Stored Products*
614 *Research* 86:101558.

615 Johnson, Joel B. and Mani Naiker. 2019. "Seeing Red: A Review of the Use of
616 near-Infrared Spectroscopy (NIRS) in Entomology." *Applied Spectroscopy*
617 *Reviews* 0(0):1–30.

618 Kamhawi, Shaden. 2006. "Phlebotomine Sand Flies and Leishmania Parasites:
619 Friends or Foes?" *Trends in Parasitology*.

620 Kather, Ricarda and Stephen J. Martin. 2012. "Cuticular Hydrocarbon Profiles as a
621 Taxonomic Tool: Advantages, Limitations and Technical Aspects."
622 *Physiological Entomology* 37(1):25–32.

623 Kelly Liebman, Isabel Swamidoss, Lucrecia Vizcaino, Audrey Lenhart, Floyd
624 Dowell, and Robert Wirtz. 2015. "The Influence of Diet on the Use of Near- 625
Infrared Spectroscopy to Determine the Age of Female Aedes Aegypti
626 Mosquitoes Kelly." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92(5):1070–75.

627 Killick-Kendrick, R. 1999. "The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies."
628 *Clinics in Dermatology* (99):279–89.

629 Kinzner, Martin Carl, Herbert C. Wagner, Andrea Peskoller, Karl Moder, Floyd E. 630
Dowell, Wolfgang Arthofer, Birgit C. Schlick-Steiner, and Florian M. Steiner.
631 2015. "A Near-Infrared Spectroscopy Routine for Unambiguous Identification
632 of Cryptic Ant Species." *PeerJ* 2015(9).

633 Krajacich, Benjamin J., Jacob I. Meyers, Haoues Alout, Roch K. Dabiré, Floyd E.
634 Dowell, and Brian D. Foy. 2017. "Analysis of near Infrared Spectra for Age-
635 Grading of Wild Populations of Anopheles Gambiae." 1–13.

636 Lambert, Ben, Maggy T. Sikulu-Lord, Vale S. Mayagaya, Greg Devine, Floyd
637 Dowell, and Thomas S. Churcher. 2018. "Monitoring the Age of Mosquito
638 Populations Using Near-Infrared Spectroscopy." *Scientific Reports* 8(1):1–9.

639 Lehane, H. J. 1985. "Determining the Age of an Insect." (3):81–85.

640 Liebman, Kelly, Isabel Swamidoss, Lucrecia Vizcaino, Audrey Lenhart, Floyd
641 Dowell, and Robert Wirtz. 2015. "The Influence of Diet on the Use of Near- 642
Infrared Spectroscopy to Determine the Age of Female Aedes Aegypti
643 Mosquitoes The Influence of Diet on the Use of Near-Infrared Spectroscopy to
644 Determine the Age of Female Aedes Aegypti Mosquitoes." (March).

645 Mayagaya, Valeliana S., Kristin Michel, Mark Q. Benedict, Gerry F. Killeen, Robert
646 A. Wirtz, Heather M. Ferguson, and Floyd E. Dowell. 2009. "Non-Destructive
647 Determination of Age and Species of Anopheles Gambiae s.l. Using near-
648 Infrared Spectroscopy." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*
649 81(4):622–30.

650 Milali, Masabho P., Maggy T. Sikulu-Lord, Samson S. Kiware, Floyd E. Dowell,
651 George F. Corliss, and Richard J. Povinelli. 2019. "Age Grading An. Gambiae
652 and An. Arabiensis Using near Infrared Spectra and Artificial Neural
653 Networks." *PLoS ONE* 14(8):1–17.

654 Moraes, C. S., K. Aguiar-Martins, S. G. Costa, P. A. Bates, R. J. Dillon, and F. A.
655 Genta. 2018. " Second Blood Meal by Female Lutzomyia Longipalpis:656
Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and
657 Leishmania Infection ." *BioMed Research International* 2018:1–10.

658 Ong, Oselyne T. W., Elise A. Kho, Pedro M. Esperança, Chris Freebairn, Floyd E.
659 Dowell, Gregor J. Devine, and Thomas S. Churcher. 2020. "Ability of Near-
660 Infrared Spectroscopy and Chemometrics to Predict the Age of Mosquitoes
661 Reared under Different Conditions." *Parasites and Vectors* 13(1):1–10.

662 OPAS. 2019. "Manual de Procedimientos Para Vigilancia y Control de Las
663 Leishmaniasis En Las Américas." 183.

664 Pasquini, Celio. 2018. "Analytica Chimica Acta Near Infrared Spectroscopy : A
665 Mature Analytical Technique with New Perspectives e A Review." *Analytica*
666 *Chimica Acta* 1026:8–36.

- 667 Perez-mendoza, Author Joel, James E. Throne, Floyd E. Dowell, E. James, Joel
668 Perez-mendoza, James E. Throne, and Floyd E. Dowell. 2004. "Chronological
669 Age-Grading of Three Species of Stored-Product Beetles by Using Near-
670 Infrared Spectroscopy Chronological Age-Grading of Three Species of Stored-
671 Product Beetles by Using Near-Infrared Spectroscopy." *Journal of Economic
672 Entomology* 97(3):1159–67.
- 673 Rangel, Elizabeth F., Ralph Lainsou, Bruno M. Carvalho, Simone M. Costa, and
674 Jeffrey J. Shaw. 2018. *Sand Fly Vectors of American Cutaneous
675 Leishmaniasis in Brazil*.
- 676 Ready, Paul D. 2013. "Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease
677 Agents." *Annual Review of Entomology* 58(1):227–50.
- 678 Reeves, W. K., K. H. S. Peiris, E. J. Scholte, R. A. Wirtz, and F. E. Dowell. 2010.
679 "Age-Grading the Biting Midge *Culicoides Sonorensis* Using near-Infrared 680
Spectroscopy." *Medical and Veterinary Entomology* 24(1):32–37.
- 681 Resh, Vicent H. .. and Ring T. Cardé. 2009. *Enciclopedia of Insects*. Vol. 1.
- 682 Roggo, Yves, Pascal Chalus, Lene Maurer, Carmen Lema-Martinez, Aurélie
683 Edmond, and Nadine Jent. 2007. "A Review of near Infrared Spectroscopy
684 and Chemometrics in Pharmaceutical Technologies." *Journal of
685 Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(3 SPEC. ISS.):683–700.
- 686 Santos, Lilha M. B., Mathijs Mutsaers, Gabriela A. Garcia, Mariana R. David,
687 Márcio G. Pavan, Martha T. Petersen, Jessica Corrêa-Antônio, Dinair Couto-
688 Lima, Louis Maes, Floyd Dowell, Anton Lord, Maggy Sikulu-Lord, and Rafael
689 Maciel-de-Freitas. 2021. "High Throughput Estimates of Wolbachia, Zika and
690 Chikungunya Infection in *Aedes Aegypti* by near-Infrared Spectroscopy to
691 Improve Arbovirus Surveillance." *Communications Biology* 4(1).
- 692 Santos, Lilha M.B., Mathijs Mutsaers, Gabriela A. Garcia, Mariana R. David,
693 Márcio G. Pavan, Martha T. Petersen, Jessica Corrêa-Antônio, Dinair Couto-
694 Lima, Louis Maes, Floyd Dowell, Anton Lord, Maggy Sikulu-Lord, and Rafael
695 Maciel-de-Freitas. 2021. "High Throughput Estimates of Wolbachia, Zika and

696 Chikungunya Infection in *Aedes Aegypti* by near-Infrared Spectroscopy to
697 Improve Arbovirus Surveillance." *Communications Biology* 4(1).

698 Santos, Poliana Macedo, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Marco Aurélio Guerra
699 Pimentel, and Marcelo Martins Sena. 2019. "Non-Destructive Screening
700 Method for Detecting the Presence of Insects in Sorghum Grains Using near
701 Infrared Spectroscopy and Discriminant Analysis." *Microchemical Journal*
702 149(July):104057.

703 Serafim, Tiago D., Iliano V. Coutinho-Abreu, Fabiano Oliveira, Claudio Meneses,
704 Shaden Kamhawi, and Jesus G. Valenzuela. 2018. "Sequential Blood Meals
705 Promote *Leishmania* Replication and Reverse Metacyclogenesis Augmenting
706 Vector Infectivity." *Nature Microbiology* 3(5):548–55.

707 Siegwart, Myriam, Floriane Bouvier, Sandrine Maugin, Alain Lecomte, and Claire
708 Lavigne. 2015. "Differentiating Oriental Fruit Moth and Codling Moth (Lepi-
709 Doptera : Tortricidae) Larvae Using Near-Infrared Spectroscopy."
710 (Balachowsky 1966).

711 Sikulu-Lord, Maggy T., Gregor J. Devine, Leon E. Hugo, and Floyd E. Dowell.
712 2018. "First Report on the Application of Near-Infrared Spectroscopy to Predict
713 the Age of *Aedes Albopictus* Skuse." *Scientific Reports* 8(1).

714 Sikulu-Lord, Maggy T., Marta F. Maia, Masabho P. Milali, Michael Henry, Gustav
715 Mkandawile, Elise A. Kho, Robert A. Wirtz, Leon E. Hugo, Floyd E. Dowell, 716
and Gregor J. Devine. 2016. "Rapid and Non-Destructive Detection and
717 Identification of Two Strains of *Wolbachia* in *Aedes Aegypti* by Near-Infrared
718 Spectroscopy." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(6).

719 Sikulu-Lord, Maggy T., Masabho P. Milali, Michael Henry, Robert A. Wirtz, Leon E.
720 Hugo, Floyd E. Dowell, and Gregor J. Devine. 2016. "Near-Infrared
721 Spectroscopy, a Rapid Method for Predicting the Age of Male and Female
722 Wild-Type and *Wolbachia* Infected *Aedes Aegypti*." *PLoS Neglected Tropical*
723 *Diseases* 10(10).

724 Sikulu, Maggy, Kayla M. Dowell, Leon E. Hugo, Robert A. Wirtz, Kristin Michel,

725 Kamaranga Hs Peiris, Sarah Moore, Gerry F. Killeen, and Floyd E. Dowell.
726 2011. "Evaluating RNAlater® as a Preservative for Using Near-Infrared
727 Spectroscopy to Predict Anopheles Gambiae Age and Species." *Malaria*
728 *Journal* 10(1):186.

729 Sikulu, Maggy, Gerry F. Killeen, Leon E. Hugo, Peter A. Ryan, Kayla M. Dowell,⁷³⁰
Robert A. Wirtz, Sarah J. Moore, and Floyd E. Dowell. 2010. "Near-Infrared
731 Spectroscopy as a Complementary Age Grading and Species Identification
732 Tool for African Malaria Vectors." *Parasites and Vectors* 3(1):1–7.

733 Sikulu, Maggy T., Silas Majambere, Bakar O. Khatib, Abdullah S. Ali, Leon E.
734 Hugo, and Floyd E. Dowell. 2014. "Using a Near-Infrared Spectrometer to
735 Estimate the Age of Anopheles Mosquitoes Exposed to Pyrethroids." 9(3):5–
736 10.

737 Subramanian, A., V. Prabhakar, and The Ohio. 2016. *Analytical Methods : Infrared*
738 *Spectroscopy in Dairy Analysis*. Elsevier.

739 Tátilla-Ferreira, Aline, Gabriela A. Garcia, Lilha M. B. dos Santos, Márcio G. Pavan,
740 Carlos José Carlos, Juliana C. Victoriano, Renato da Silva-Junior, Jacenir R.
741 dos Santos-Mallet, Thaiane Verly, Constança Britto, Maggy T. Sikulu-Lord,
742 and Rafael Maciel-de-Freitas. 2021. "Near Infrared Spectroscopy Accurately
743 Detects Trypanosoma Cruzi Non-Destructively in Midguts, Rectum and
744 Excreta Samples of Triatoma Infestans." *Scientific Reports* 11(1):1–10.

745 Valladares, Vanessa, Célio Pasquini, Silvana C. Thiengo, Monica A. Fernandez,
746 and Clélia C. Mello-Silva. 2021. "Field Application of NIR Spectroscopy for the
747 Discrimination of the Biomphalaria Species That Are Intermediate Hosts of
748 Schistosoma Mansoni in Brazil." *Frontiers in Public Health* 9(March):1–8.

749 Vogt, W. G. and J. M. Walker. 1987. "Influences of Temperature , Fly Size and⁷⁵⁰
Protein-Feeding Regime on Ovarian Development Rates in the Australian
751 Bush Fly , Musca Vetustissima." *Entomologia Experimentalis et Applicata*
752 101–13.

753

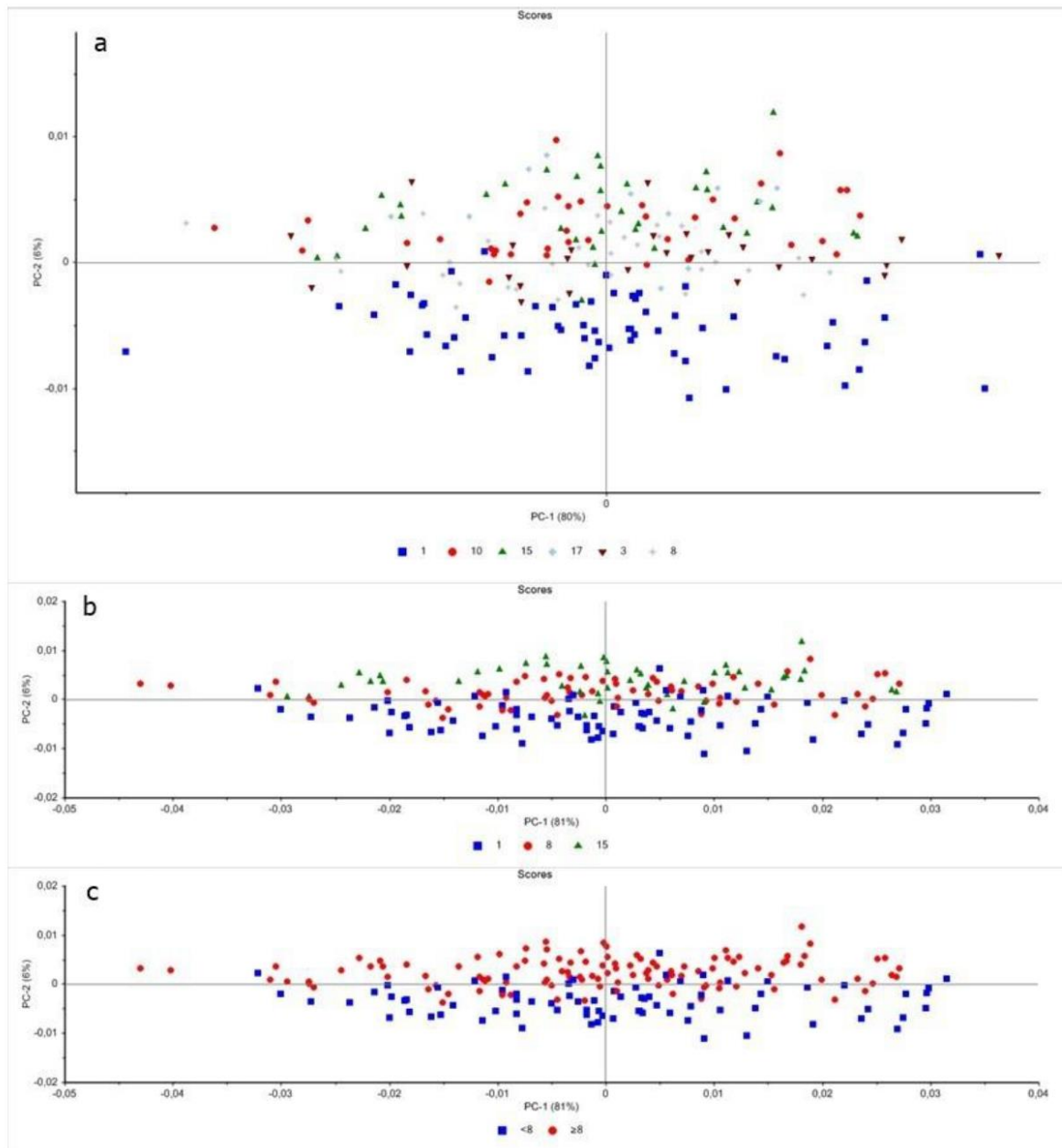


Figure 1

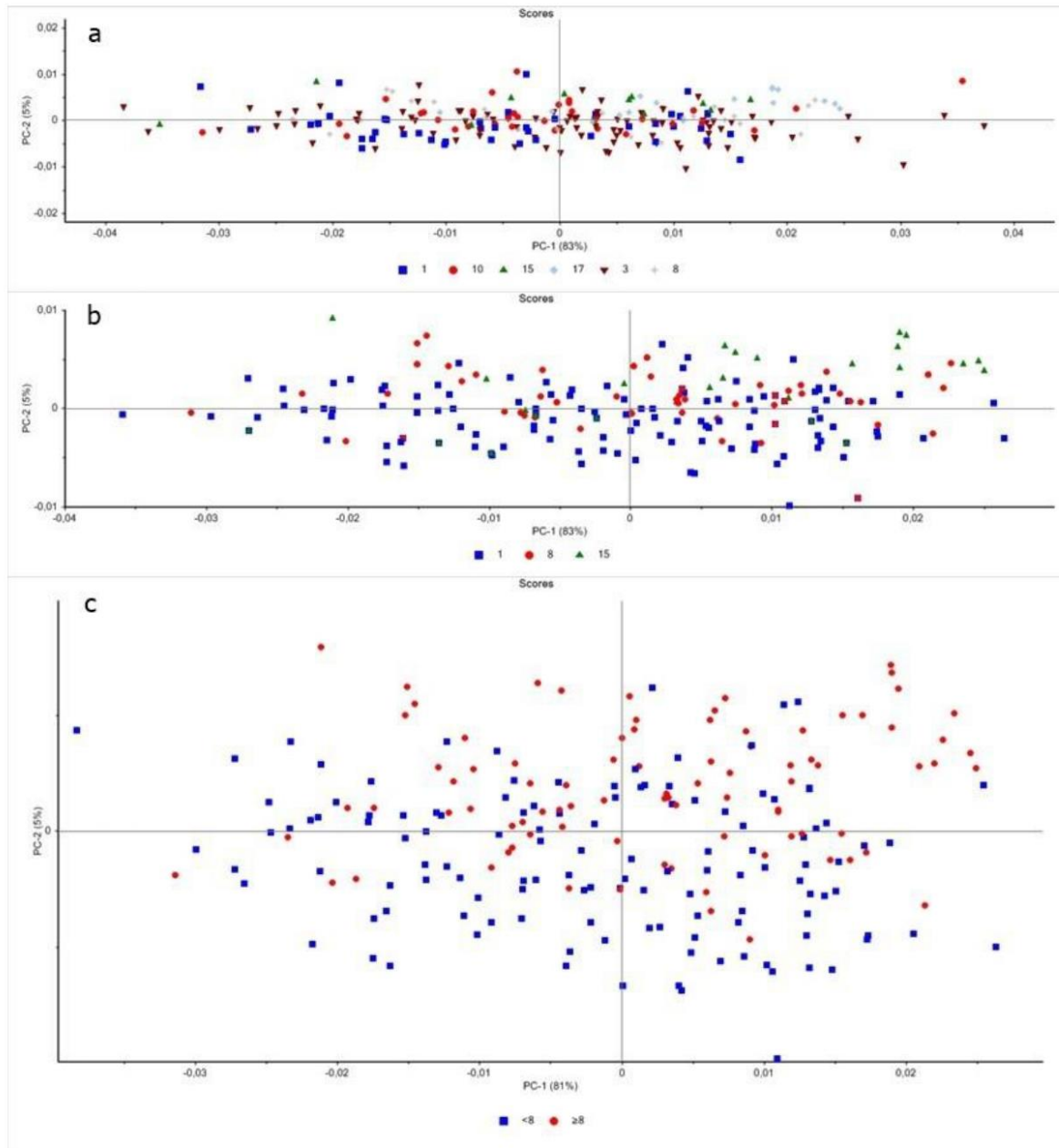


Figure 2

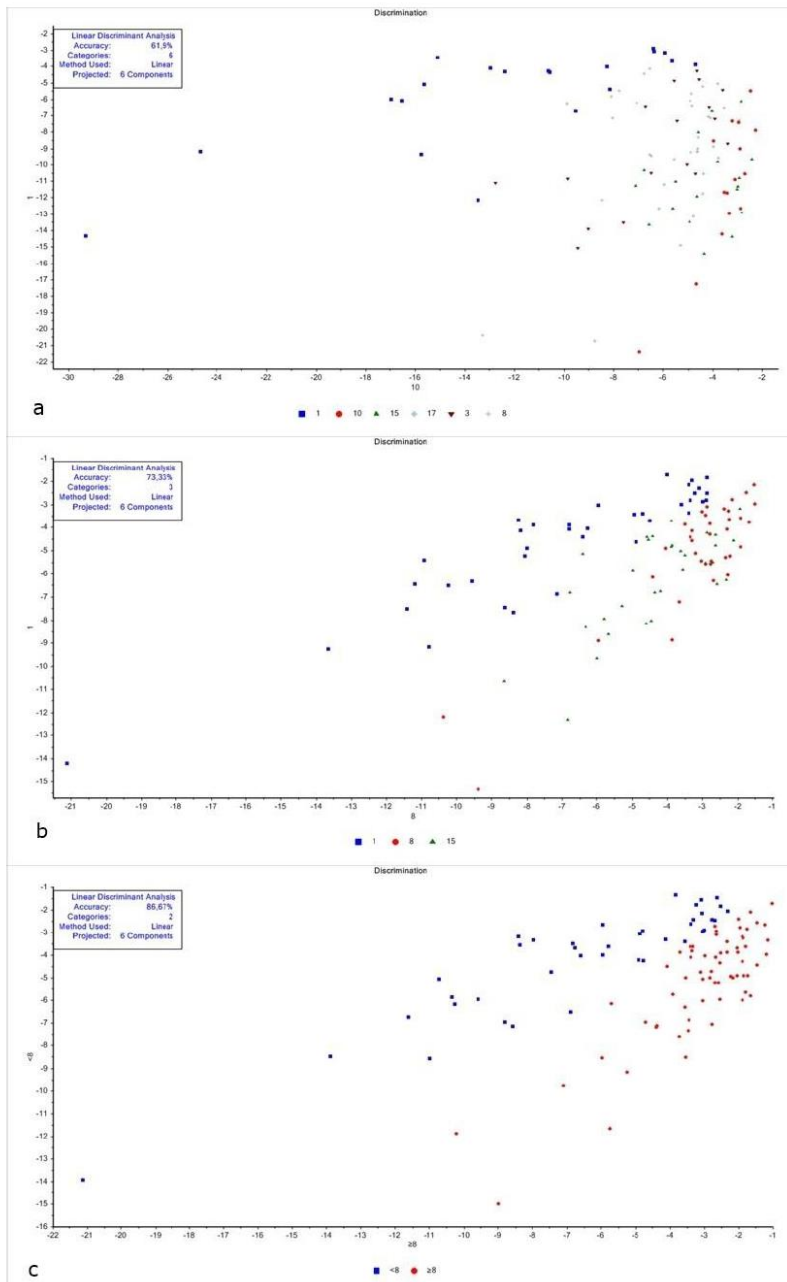


Figure 3

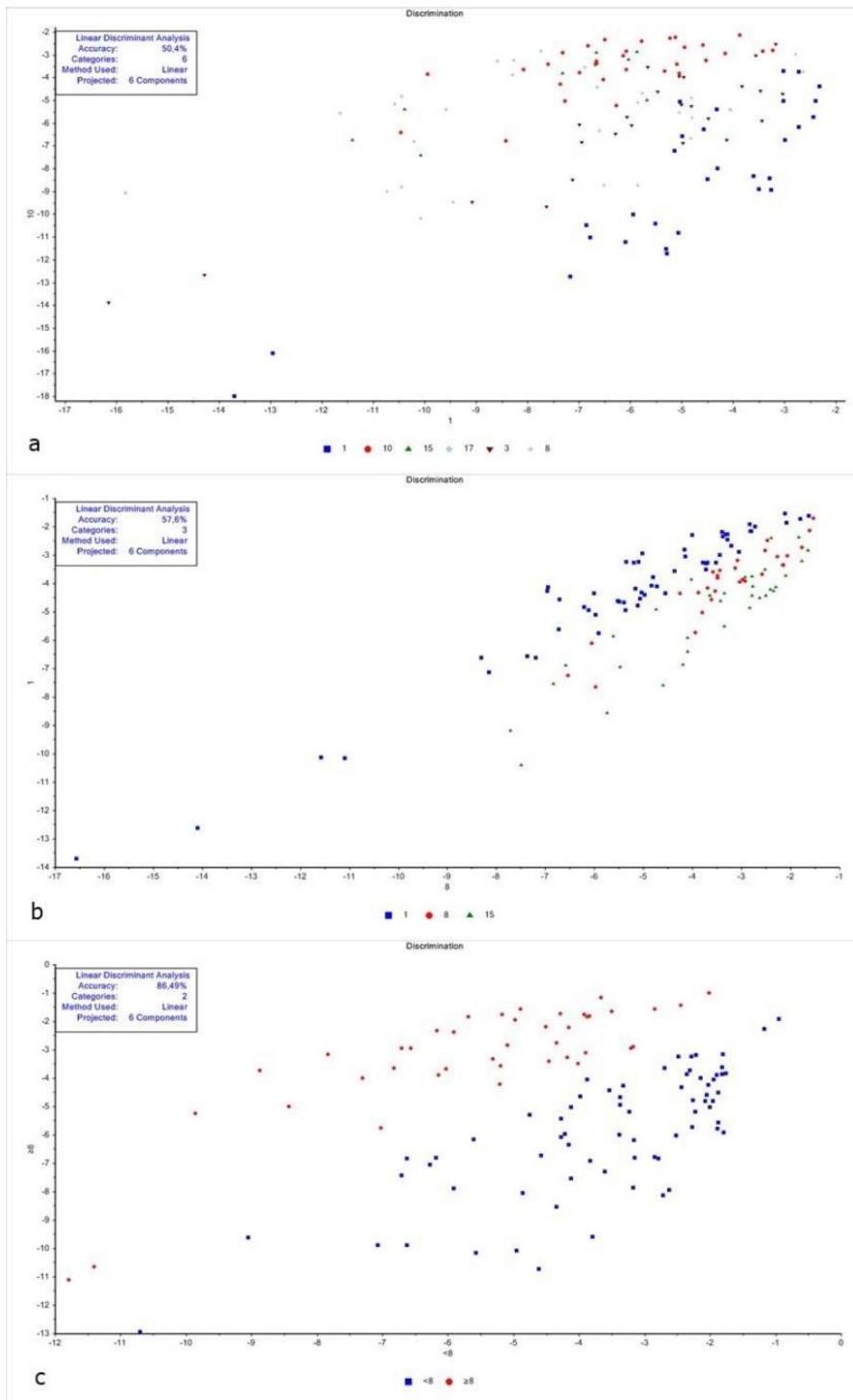


Figure 4

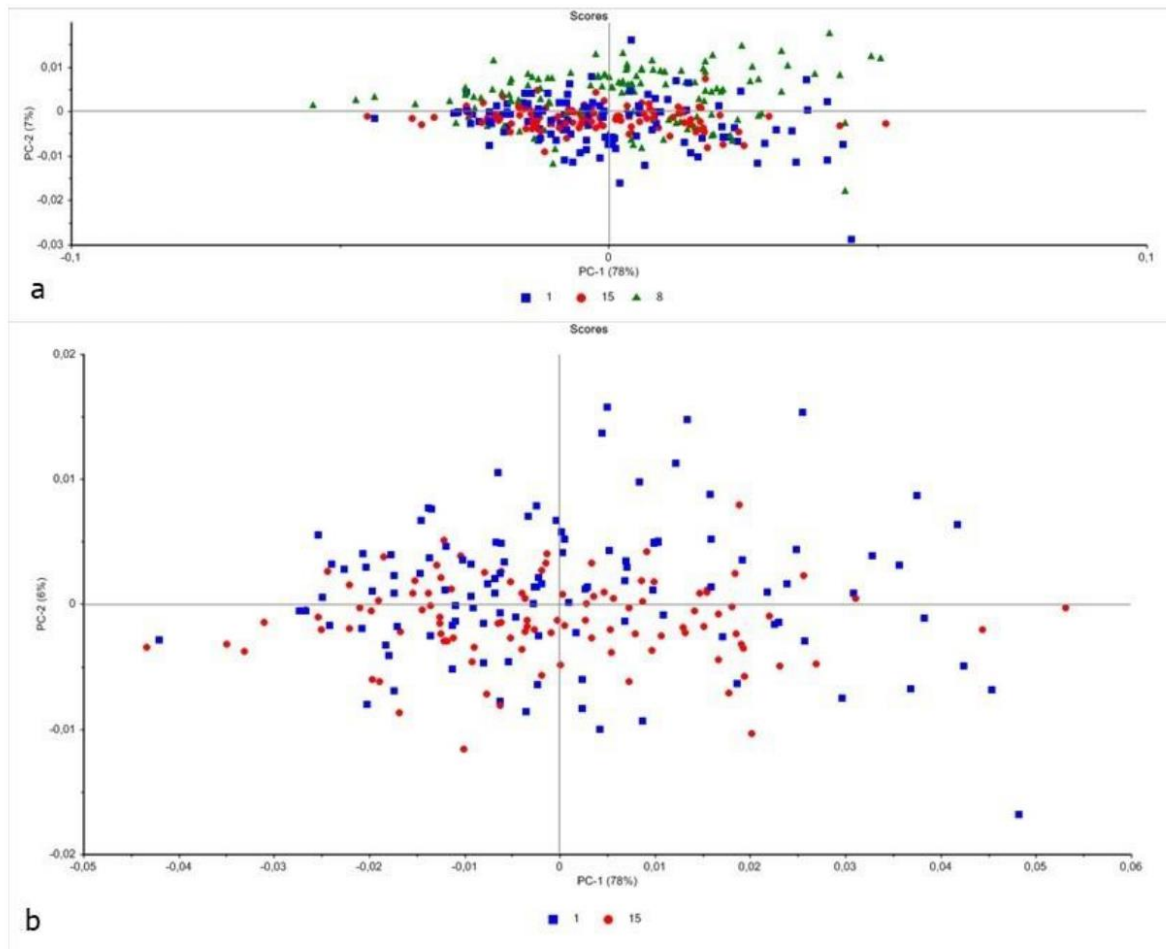


Figure 5

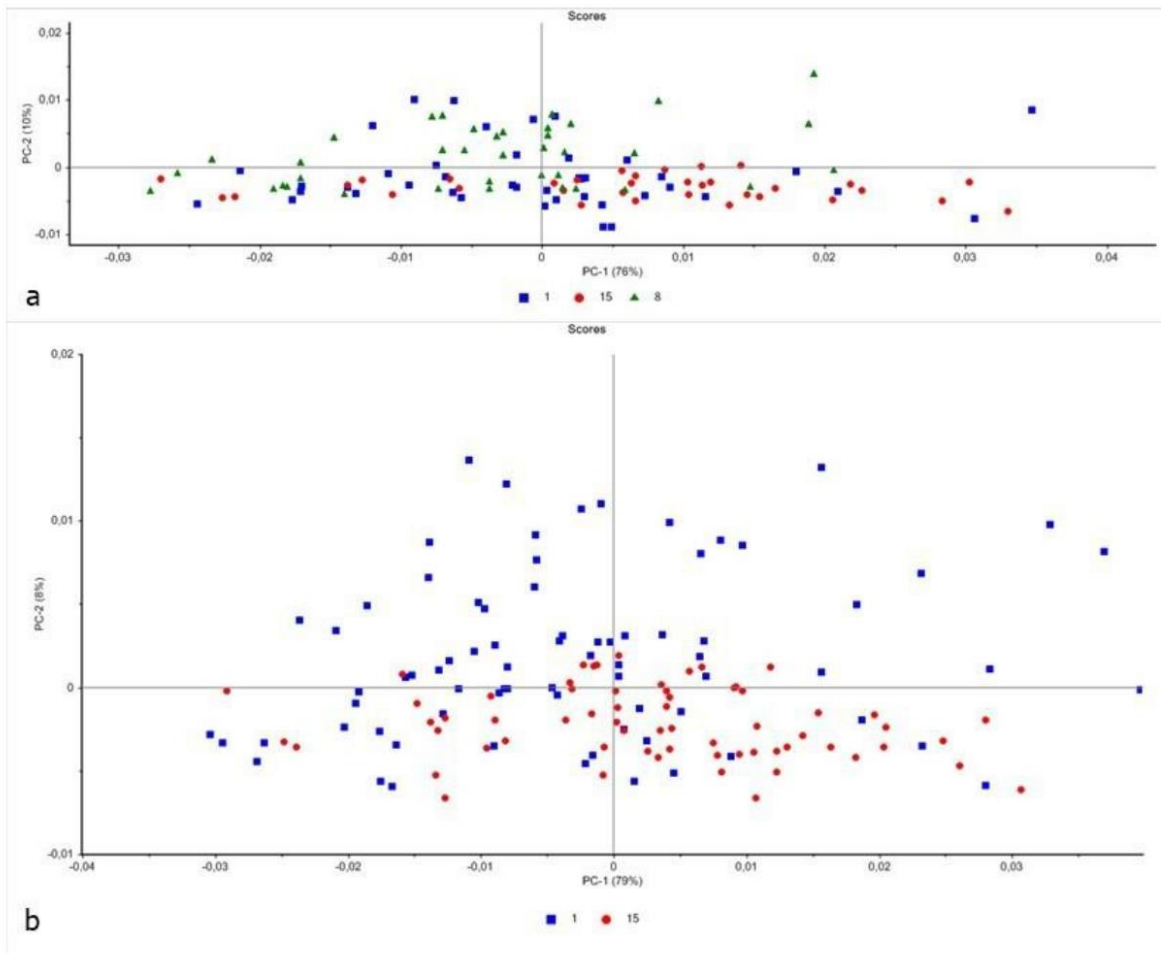


Figure 6

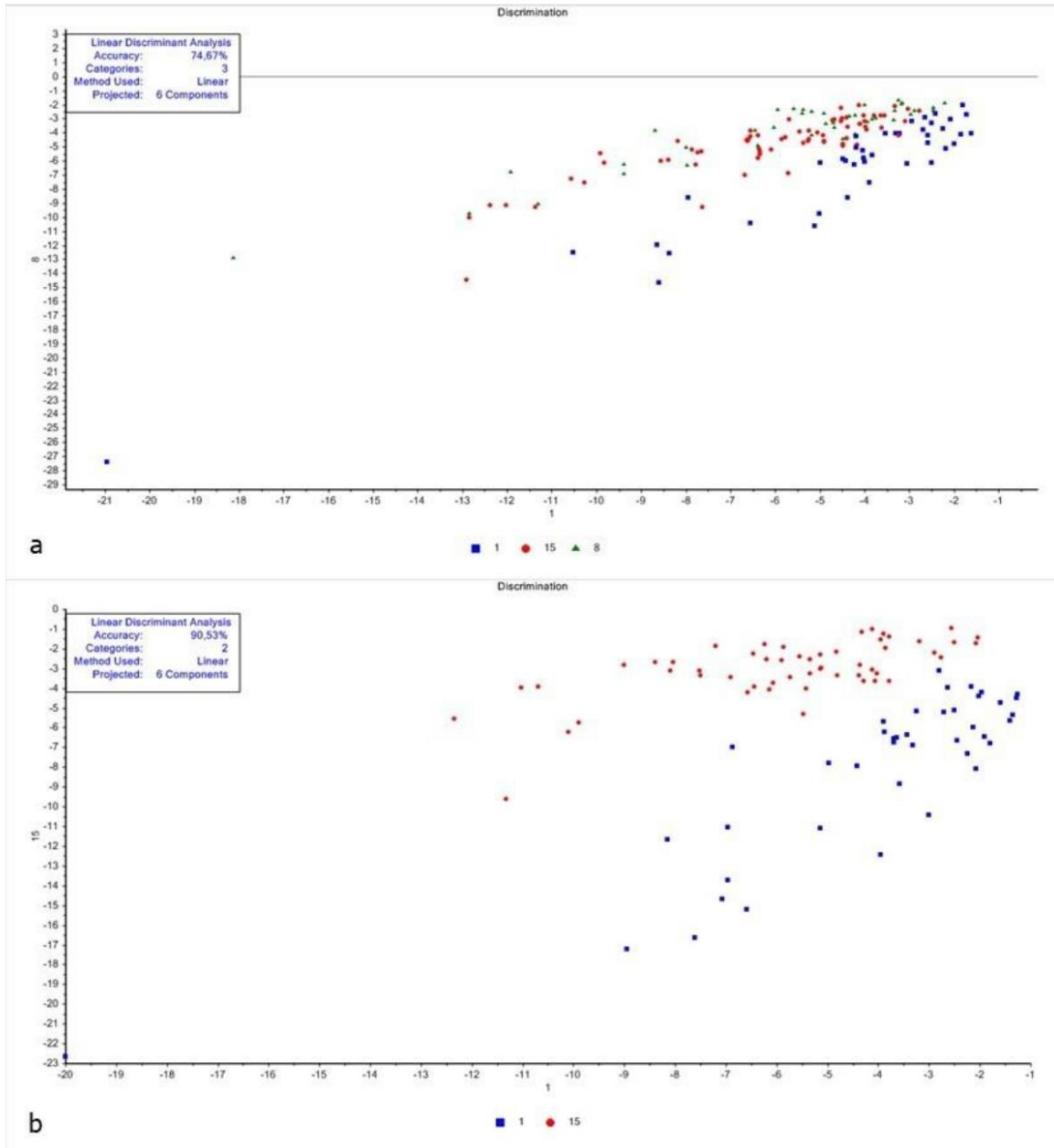


Figure 7

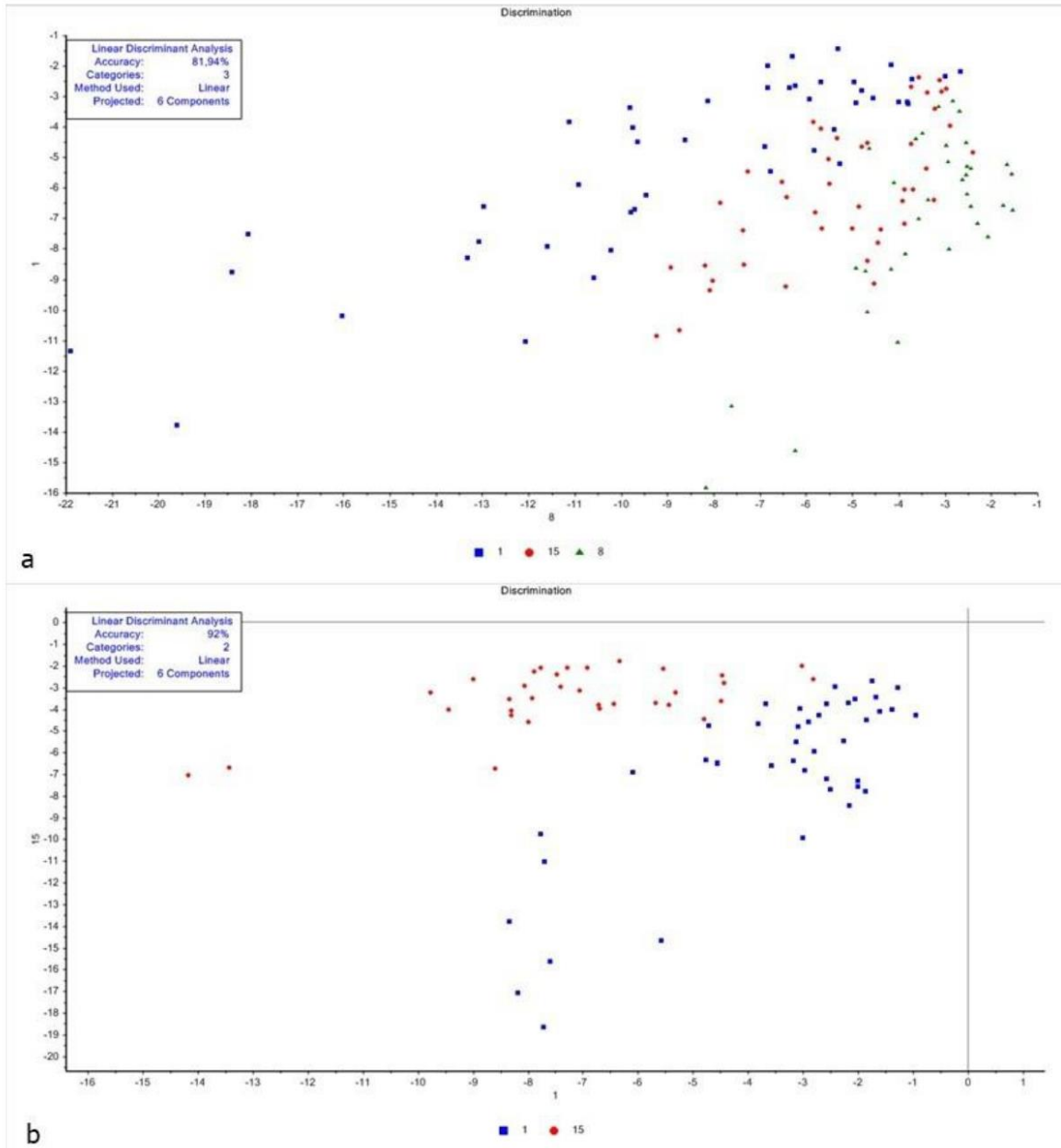


Figure 8

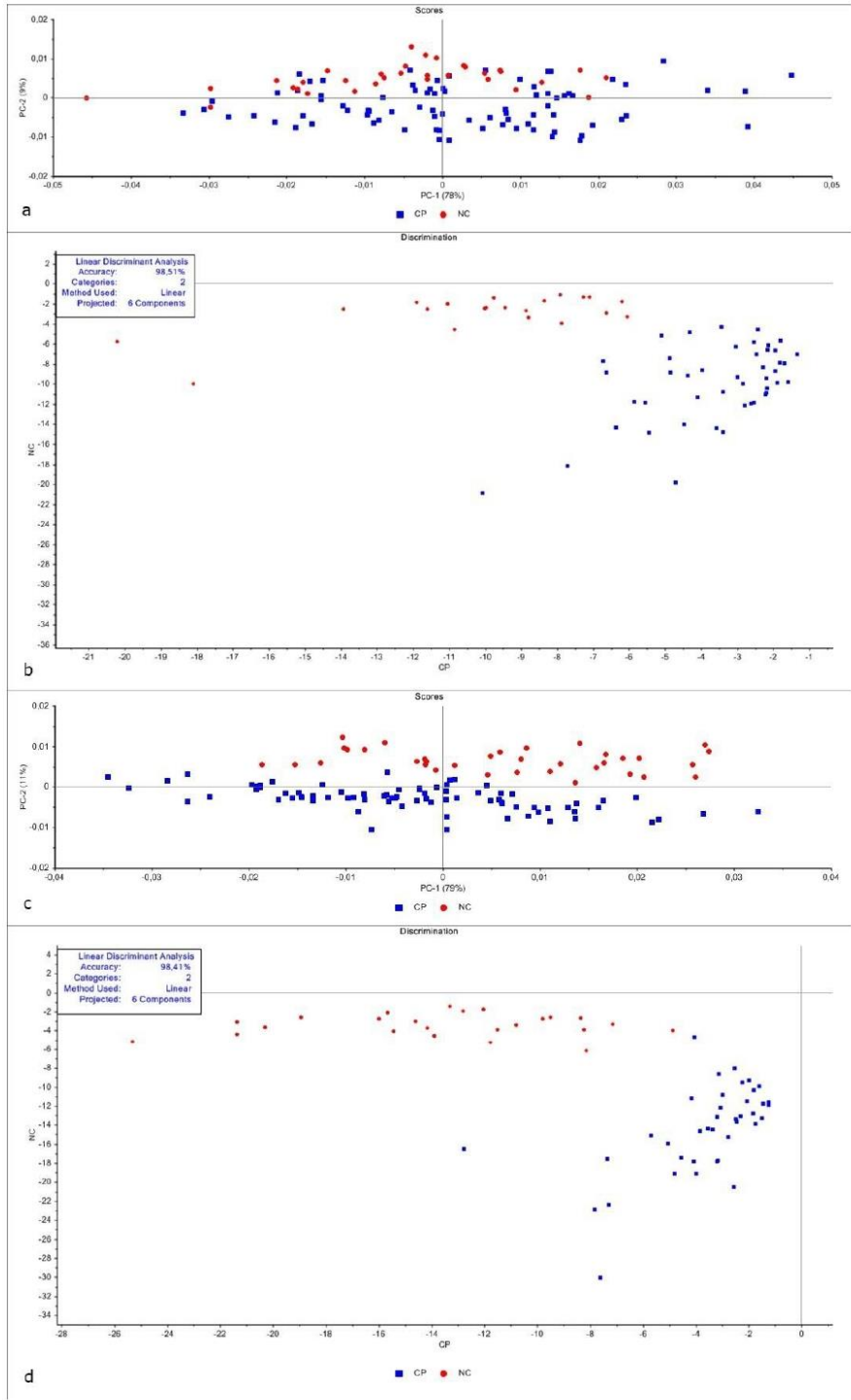


Figure 9

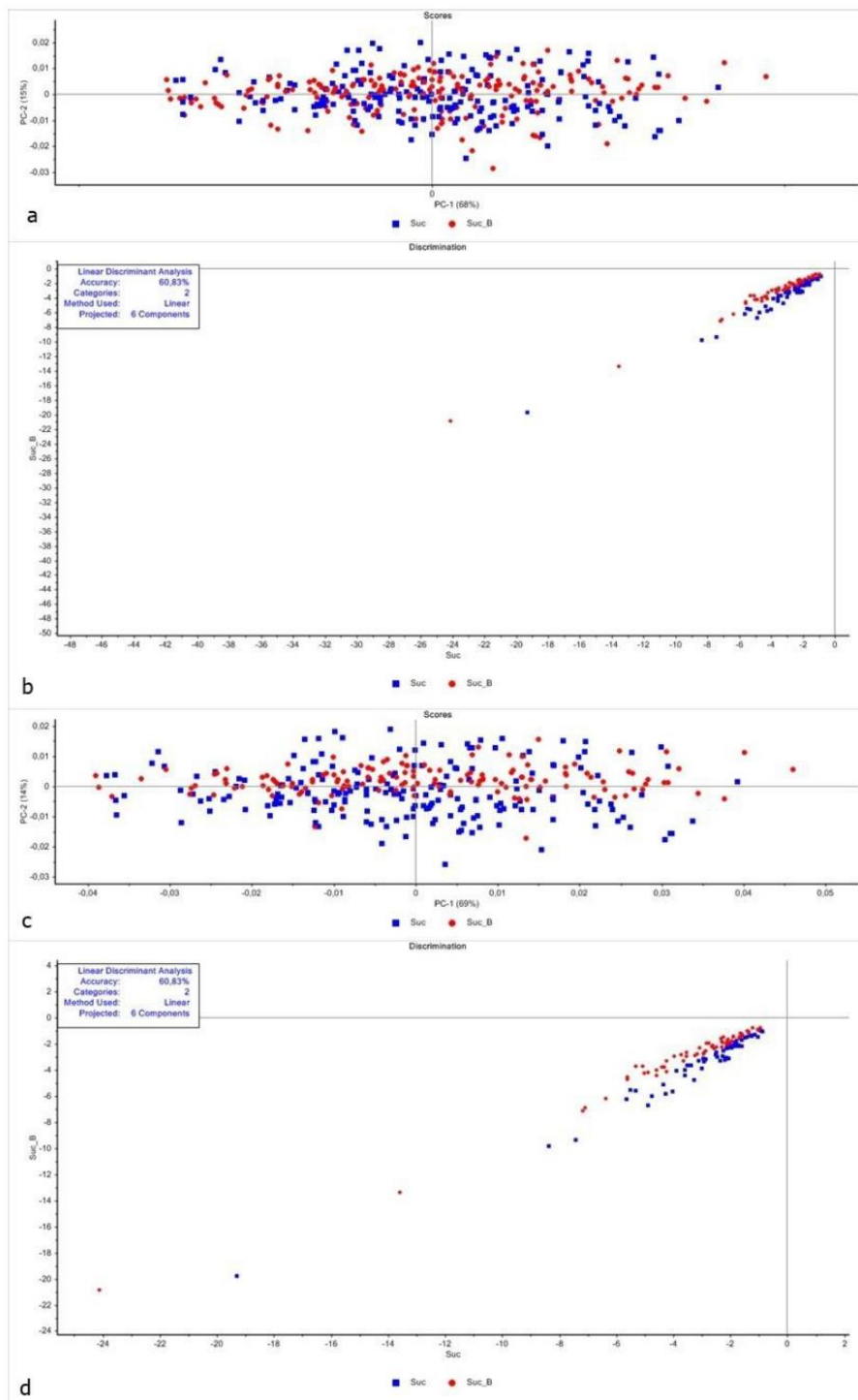
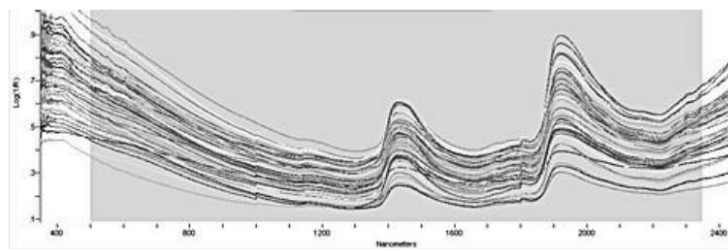


Figure 10



Supplementary Figure 1

**Pest Management Science**[JOURNAL HOME](#)[AUTHOR GUIDELINES](#)[EDITORIAL CONTACT](#)

Powered by Atypon ReX

Submission Overview

This manuscript has been submitted to the editorial office for review. Changes cannot be made during editorial review, but you can view the information and files you submitted, below.

Article Type	Research Article		
Title	Age, sex and mating status discrimination in the sand fly <i>Lutzomyia longipalpis</i> using Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS)		
Manuscript Files	Name	Type of File	Size
	Ferreira et al 2022.docx	Main Document - MS Word	141.2 KB
	Figure 1 - PCA females.jpg	Figure	181.3 KB
	Figure Sup_1 - spectra example.jpg	Figure	32 KB
	Figure 2 - PCA males.jpg	Figure	199 KB
	Figure 3 - LDA females long.jpg	Figure	172.1 KB
	Figure 4 - LDA males long.jpg	Figure	177.9 KB
	Figure 5 - PCA females long group.jpg	Figure	129.8 KB
	Figure 6 - PCA males long junt.jpg	Figure	109.9 KB
	Figure 7 - LDA females long.jpg	Figure	119.5 KB
Figure 8 - LDA males long.jpg	Figure	123 KB	

Name	Type of File	Size
Figure 9 - PCA LDA males_fem cp x ncp.jpg	Figure	197.4 KB
Figure 10 - PCA LDA blood x suc.jpg	Figure	246.1 KB
Graphical Abstract Text.docx	Graphical Abstract Text	12.4 KB
graphical abstract.tif	Graphical Abstract Image	417.2 KB

Abstract


Aiming a better control of vector-borne diseases, it is essential to understand aspects related to the physiology and capacity of the vector. The sand fly *Lutzomyia longipalpis* has great importance in medical entomology for disseminating *Leishmania* parasites, the causative agent of Leishmaniasis, one of the main neglected diseases listed by WHO. In this respect, it is necessary to evaluate the transmission potential of this species as well as the success of vector control interventions. Near-infrared spectroscopy (NIRS) has been used as a tool for age estimation for mosquitoes in different conditions (laboratory, semi-field, and conservation), taxonomic analysis, and infection detection. However, there are no studies using NIRS for sand flies. In this study, we developed analytic models to estimate the age of *L. longipalpis* adults under laboratory conditions, identify their copulation state, and evaluate their gonotrophic cycle and diet. Sand flies were classified with an accuracy of 58-82% in 3 age groups and 82-92% when separating them into young (<8 days) or old (>8 days) insects. The classification between mated and non-mated sandflies was 98-100% accurate, while the percentage of hits of females that had already passed the first gonotrophic cycle was only 59%. We consider the results of age and copula estimation very promising, as they provide important aspects of vector capacity assessment which can be obtained quickly and at a lower cost with NIRS.

Authors

Name	Email	Country/Location
Tainá Neves Ferreira ¹	fnevestaina@gmail.com	Brazil
Lilha M. B. Santos ²	lilha@barbosa@gmail.com	Brazil
Vanessa Valladares ³	Vanessavalladarescm@gmail.com	Brazil
Catherine Flanley ⁴	cflanley@gmail.com	United States
Mary Ann McDowell ⁴	mmcdowe1@nd.edu	United States

Gabriela A. Garcia ²	gabiazambuja@hotmail.com	Brazil
Clélia C. Mello-Silva ³	cleliachristinamellosilva@gmail.com	Brazil
Rafael Maciel-de-Freitas ^{2,5}	macieldefreitas@gmail.com	Brazil
Fernando Ariel Genta ^{1,5}	gentafernando@gmail.com	Brazil

Corresponding Author

 [0000-0001-9558-1116](https://orcid.org/0000-0001-9558-1116)

Affiliations

1. Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil
2. Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil
3. Malacology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil
4. Eck Institute for Global Health, Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, IN, USA
5. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, Brazil

Additional Information

Funders

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Fundação Oswaldo Cruz

Keywords

Lutzomyia longipalpis; NIRS; age; sand fly; *Leishmania*; discriminant classification

Suggested Editor

Daniel Swale

Is this submission for a special issue?

No, this is not for a special issue

Has this manuscript been submitted previously to this journal?

No, it wasn't submitted previously

Animal Subjects

This research involved animal subjects AND it complies with ARRIVE guidelines

Social media mention preferences

Suggested Tweet: First time use of Near InfraRed Spectroscopy (NIRS), a cheap and fast technique for insect surveillance, for the determination of age and mating status of sand flies, vectors of Leishmaniasis.

Twitter Account: @labfisi

Do you or any of your co-authors have a conflict of interest to disclose?

No, there is no conflict of interest

Suggested Reviewers

Michael Toews
mtoews@uga.edu
University of Georgia Coastal Plain Research Arboretum
Wencang Zhao
wencangzhao@gmail.com
Qingdao University of Science and Technology College of
Electromechanical Engineering
Kassio Lima
kassiolima@gmail.com
Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciencias
da Saude
Michael Riehle
mriehle@ag.arizona.edu
Univ Arizona, Dept Entomol
Oselyne Ong
oselyne.ong@qimrberghofer.edu.au
QIMR Berghofer Med Res Inst
Maggy Sikulu
maggy.sikulu@qimrberghofer.edu.au
QIMR Berghofer Med Res Inst
Alvaro Acosta-Serrano
Alvaro.Acosta-Serrano@lstm.ac.uk
Liverpool School of Tropical Medicine

Opposed Reviewers

No response provided

Cover Letter / Comments

No, I don't have additional comments

History

Submitted On 7 June 2022 by Fernando Genta

> [Show this version history](#)

Submission Started 7 June 2022 by Fernando Genta

[Privacy policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Contact us](#) | [Help](#) | [Cookie Preferences](#)

©Atypon Systems, LLC **Atypon ReX**



Taina Ferreira <fnevestaina@gmail.com>

Manuscript submitted to Pest Management Science - PM-22-0725, Author's Copy

1 mensagem

PMSci Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

8 de junho de 2022 23:22

Responder a: pestmansci@wiley.com

Para: gentafernando@gmail.com

Cc: fnevestaina@gmail.com, lilhabarbosa@gmail.com, Vanessavalladarescm@gmail.com, cflanley@gmail.com, mmdowd1@nd.edu, gabiazambuja@hotmail.com, celiachristinamelosilva@gmail.com, macieldefreitas@gmail.com, gentafernando@gmail.com

08-Jun-2022

Manuscript number: PM-22-0725, Age, sex and mating status discrimination in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* using Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS) by Ferreira, Tainá Neves; Santos, Lílha M. B.; Valladares, Vanessa; Flanley, Catherine; McDowell, Mary Ann; Garcia, Gabriela A.; Mello-Silva, Clélia C.; Maciel-de-Freitas, Rafael; Genta, Fernando

Dear Dr Genta,

Thank you for submitting the above manuscript to Pest Management Science. The paper is under consideration and you will be informed of the status when the refereeing process has been completed.

You can view the status of your manuscript at any time by logging into the submission site at <https://wiley.atyponrex.com/journal/PS>.

Please remember in any future correspondence regarding this article to always include its manuscript ID number PM-22-0725.

NOTE FOR REVISED SUBMISSIONS FROM SCHOLARONE

If this is a revised submission for a manuscript originally submitted in ScholarOne, please note that a new manuscript ID has been provided. If you selected that this is a revised submission during the Research Exchange submission, it will be linked to your original submission and processed as a revised submission.

If you have co-authors on this paper you must ensure that they are all aware that the paper has been submitted to this journal.

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

As a thank you for submitting your paper to PMSci we would like to offer you free e-membership to the Society of Chemical Industry (SCI). With this e-membership you will receive a free online copy of C&I magazine. To take advantage of this great opportunity please follow the link, select the 'e-Member' option complete the required information and enter the code: MOO22WM.
<https://www.soci.org/members/registration?type=e-Member>

Yours sincerely,

Editorial Office
Pest Management Science

3.3. CAPÍTULO 3

A ser submetido ao periódico "Pest Management Science".

Efeitos de compostos anti-*Leishmania* na fisiologia e capacidade vetorial do vetor, *Lutzomyia longipalpis*

Autores: Tainá Neves Ferreira, Samara Graciane Costa Latgé, Edézio Ferreira Cunha-Júnior, Paulo Roberto Ribeiro Costa, Chaquip Daher Netto, Mary Ann McDowell, Eduardo Caio Torres Santos, Tadeu Diniz Ramos, Herbert Leonel de Matos Guedes, Fernando Ariel Genta

3.3.1. Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* através da picada de fêmeas de flebotomíneos (OMS, 2022; Brasil, 2017). Segundo a OMS e OPAS, estão listadas como uma das dez principais doenças tropicais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas atualmente, 0,9 a 1,6 milhão de novos casos a cada ano e entre 20.000 e 30.000 mortes (OMS e OPAS, 2022).

Existem três formas principais da doença: leishmaniose visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (LMC), que se diferenciam pelo agente etiológico e manifestações clínicas (OMS e OPAS, 2022). A LV é considerada a forma mais perigosa por sua alta letalidade especialmente em indivíduos sem o devido tratamento, malnutridos ou ainda portadores de alguma imunodeficiência (Brasil 2014, 2016; OPAS, 2019).

A doença está amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais e é encontrada na Europa, África, Ásia e América (Alvar et al., 2012). De acordo com a OMS, o Brasil está listado entre os 10 países que mais contribuem em número de casos de LV e LC (OMS e OPAS, 2022; Torres-Guerrero et al., 2018).

Os flebotomíneos são os vetores dos parasitos causadores das leishmanioses e destacam-se os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) por sua capacidade vetorial (Mansueto et al., 2014; OPAS, 2019; Ready, 2013). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é uma das principais espécies de importância médica no Brasil, por ser o principal vetor na LV e por sua capacidade adaptativa em diversos ambientes antrópicos e permissividade a diferentes espécies de *Leishmania* (Lainson & Rangel, 2005; Ready, 2013; Salomón et al., 2015).

A disseminação dos parasitos se dá pelo fato de fêmeas de flebotomíneos serem hematófagas e necessitarem de sangue para adquirir nutrientes necessários para o desenvolvimento e maturação dos ovos. Se essa alimentação ocorre em um hospedeiro vertebrado infectado, em alguns dias os parasitos contraídos completam seu desenvolvimento no intestino do inseto, podendo ser então transmitidos a outro

hospedeiro através de um novo repasto sanguíneo (Mansueto et al., 2014; OPAS, 2019; Schlein, 1993; Steverding, 2017).

Além da alimentação sanguínea, flebotomíneos adultos alimentam-se de açúcar de origem vegetal ou de secreções de afídeos, sendo essas as suas principais fontes de carboidratos (Anez et al., 1994; Brazil & Brazil, 2018; Moraes et al., 2018; Ready, 2013). A presença de açúcar no intestino do inseto parece ser um importante estímulo para a migração e o desenvolvimento da *Leishmania* (da Costa et al., 2019).

Devido a essa necessidade da dieta de carboidratos, alguns grupos vêm estudando estratégias de controle da doença através do controle do inseto vetor usando iscas açucaradas atrativas contendo componentes inseticidas (Diarra et al., 2021; Fiorenzano, Koehler, & Xue, 2017; Fraser et al., 2021; Junnila et al., 2011; Maia et al., 2018; Müller et al., 2010; Qualls et al., 2015; Saghafipour et al., 2017; Schlein & Jacobson, 1994).

Nos últimos anos nosso grupo identificou que metabólitos secundários de plantas, adicionados à alimentação açucarada, foram capazes de reduzir a porcentagem de fêmeas infectadas e a carga parasitaria em *L. longipalpis* infectados com *L. mexicana* (Ferreira et al., 2018), em outras palavras, um efeito antiparasitário no vetor.

O estudo de compostos de origem natural impactando no desenvolvimento de *Leishmania* é um conceito desenvolvido por Schlein e Jacobson (Schlein & Jacobson, 1994; Schlein, 1993; Schlein et al., 1992) há cerca de três décadas e vem sendo continuado (Müller & Schlein, 2011; Qualls et al., 2015; Saghafipour et al., 2017) e expandido para outros vetores, principalmente mosquitos (Fiorenzano et al., 2017; Maia et al., 2018; Qualls et al., 2015).

Leishmania é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae. Até o momento são conhecidas 22 espécies patogênicas em humanos, as quais pertencem aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (OPAS, 2022). Dentro deste subgênero podemos destacar *L. amazonensis*, responsável pela forma LC difusa e LC com lesões disseminadas; *L. infantum*, causadora da LV americana com extensa distribuição na América Latina, do México à Argentina (Torres-Guerrero et al., 2018).

O parasito é heteroxênico, então, é encontrado em 2 formas distintas ao longo de seu ciclo de vida: uma forma promastigota, extracelular e flagelada encontrada no intestino de flebotomíneos; e a outra forma amastigota, arredondada e intracelular, que se multiplica em células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente macrófagos (Brasil 2017; Maroli et al. 2013; OPAS 2019).

Antimoniais (tri ou pentavalente) vêm sendo as drogas de primeira escolha usadas no tratamento de pacientes com leishmaniose desde sua descoberta, há cerca de 100 anos. A segunda opção de tratamento é feita com anfotericina B e suas diferentes formulações, ou ainda pentamidina, miltefosina ou azitromicina, esses últimos mais indicados para crianças e gestantes (Brasil, 2014, 2017; Mansueto et al., 2014).

Contudo, essas drogas apresentam algumas limitações, tais como dificuldade de administração e toxicidade, com diversos efeitos adversos (Brasil, 2014, 2017; Mansueto et al., 2014). Outra preocupação é o surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento (Mansueto et al., 2014; Tiunan et al., 2011; Tiwari et al., 2018).

Por essa razão a OMS, na assembleia mundial da saúde de 2013 (OMS, 2013), listou uma série de ações emergenciais para controle de doenças tropicais negligenciadas tais como: desenvolvimento de novos fármacos, de novas estratégias de controle vetorial e ampliação de substâncias inseticidas, entre outras.

Nesse sentido, vários grupos vêm estudando compostos naturais ou sintéticos de formulação análoga para ampliar o arsenal de fármacos disponíveis para tratamento. A exemplo disso podemos citar chalconas, flavonóides, saponinas, quinonas, alcalóides, taninos e terpenóides, que são fitoconstituintes com atividade anti-*Leishmania* e com a vantagem de serem ambientalmente amigáveis (Gervazoni et al., 2020; Sen & Chatterjee, 2011; Tiwari et al., 2018).

Dos compostos sintéticos análogos aos naturais podemos destacar as pterocarpanoquinonas, que demonstraram resultados promissores em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e em estudos com hospedeiros infectados. Contudo, uma lacuna desses estudos de prospecção de novas drogas é sua avaliação dos efeitos antiparasitários dentro do inseto vetor, investigando apenas efeitos *in vitro* e

in vivo em hospedeiros vertebrados, muitas vezes com ênfase nas formas amastigotas (Costa et al., 2014; Cunha-Júnior et al., 2016; Faiões et al., 2018; Ribeiro et al., 2013).

Pouco se sabe, por exemplo, sobre alterações sofridas pela *Leishmania* durante seu desenvolvimento no inseto. É no intestino do flebotomíneo que os parasitos precisam superar diversas barreiras do sistema imune do vetor e passar por diferentes etapas de mudança de forma, além de uma alta taxa de replicação. Este processo ocorre por divisão celular e durante esse processo pode haver troca de material e geração de progênes híbridas, permitindo o desenvolvimento de novas características (resistência) (Van Bockstal et al., 2020).

Neste cenário, nosso grupo vem avaliando a influência de diferentes compostos sintéticos com atividade anti-*Leishmania*, incluindo anfotericina B e pentamidina, em distintos aspectos da fisiologia de *L. longipalpis*, quando adicionados à dieta açucarada, tendo em vista seu uso potencial em iscas de açúcar para controle da infecção do parasito no vetor.

Em publicações prévias verificamos que essas drogas podem ter efeito atrativo ou repulsivo, podem alterar a quantidade de solução açucarada ingerida, e também podem alterar a escolha das dietas pelos insetos (Ferreira et al., 2022). Ressaltando que os compostos que tiveram sua avaliação descontinuada podem ser estudados em outros tipos de intervenções direcionadas especificamente ao inseto vetor, já que mostraram atividades inibidora de alimentação e/ou foram desprezados quando havia opção de dieta açucarada (Ferreira et al., 2022).

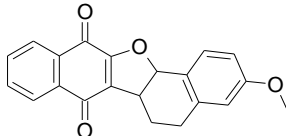
Nesse trabalho demos continuidade aos estudos com os compostos mais promissores, L2, L6, L7, P8, P9 (pentamidina) e P10 (anfotericina B) para avaliação dos seguintes aspectos: efeitos na longevidade dos adultos, influência sobre a alimentação sanguínea e oviposição e, por fim, efeito na infecção de fêmeas com *Leishmania* spp.

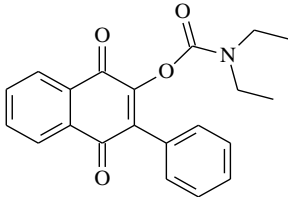
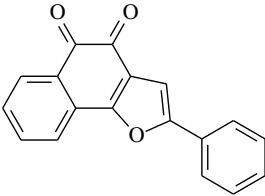
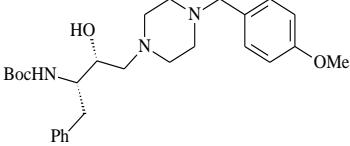
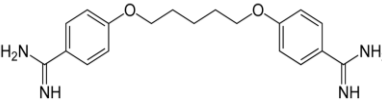
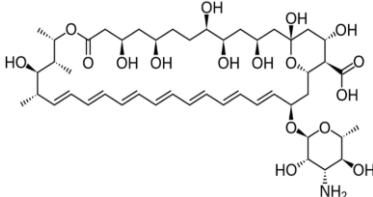
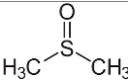
3.3.2. Material e Métodos

a) Compostos anti-*Leishmania*

As soluções açucaradas foram preparadas com sacarose vendida comercialmente (“açúcar de mesa”) sendo esterilizadas em autoclave e mantidas sob refrigeração a 4°C. As drogas testadas foram modeladas e sintetizadas no Laboratório de Química Bioorgânica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (Ribeiro et al., 2013). São compostos sintéticos análogos aos de origem natural com ação anti-promastigotas produzidos, em sua maioria, a partir de naftoquinonas e pterocarpanas (Buarque et al., 2011; Faiões et al., 2018; Ribeiro et al., 2013). Também foram utilizados os compostos de referência no tratamento de leishmaniose, como pentamidina e anfotericina B. Esses compostos foram cedidos pelo Dr. Eduardo Caio Torres (IOC-FIOCRUZ). A tabela 3.3.1 traz as informações dos compostos avaliados.

Tabela 3.3.1 – Propriedades e condições experimentais dos compostos anti-*Leishmania* utilizados neste trabalho. Os valores de IC₅₀ representam a metade da concentração inibitória máxima para *L. infantum* ou *L. amazonensis* e a concentração usada nos experimentos foi de 10 vezes o valor desse IC₅₀. - : não determinado.

Composto	Classificação /Função	Estrutura	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> / <i>L. amazonensis</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
L2	Pterocarpaquinona		1,4/ 0,4	14,0

L6	Pterocarpaquinona		-/1,98	20,0
L7	Pterocarpaquinona		1,7/ -	17,0
P8	Derivado de hidroxietilpiperazina		-/1,8	18,0
P9	Pentamidina – anel aromático diamínico/ éter		5,7/ 4,8	57,0
P10	Anfotericina B - polieno		-/2,2	22,0
DMSO	Solvente		-/-	57,0

b) Efeito de compostos sobre a longevidade de flebotomíneos

Os compostos LQB-475 (L2), LQB-181 (L6), LQ-03 (L7), PMIC-4 (P8), pentamidina (P9), anfotericina B (P10) e DMSO (solvente) foram adicionados à solução de sacarose, em concentração correspondente a 10 vezes o valor da maior IC₅₀ para *Leishmania* sp., e disponibilizados aos flebotomíneos em micro gotas sobre placa de petri coberta com parafilme (Ferreira et al., 2022). As soluções foram trocadas a cada 2 dias e os estoques mantidos em congelador (-20° C). Os insetos adultos, recém emergidos, foram separados por sexo e a mortalidade foi observada diariamente mantendo-os em incubadora em condições controladas (26°C e umidade 70%), de

acordo com trabalhos descritos previamente (Díaz-Albiter et al., 2016; Ferreira et al., 2018). O experimento foi realizado em triplicata com 20 insetos por gaiola.

c) Efeitos dos compostos sobre alimentação sanguínea e oviposição

Cerca de 30 fêmeas e 30 machos com 1-2 dias pós emergência foram separados em gaiolas e mantidos sob alimentação com solução açucarada (sacarose 70% m/v) contendo drogas antiparasitárias (LQB-475 (L2), LQB-181 (L6), LQ-03 (L7), PMIC-4 (P8), Pentamidina (P9), anfotericina B (P10), ou DMSO (solvente). Sete dias depois as fêmeas alimentaram-se de sangue através de picada em hamster anestesiado (CEUA/IOC - L-029/2016), observando-se a quantidade de fêmeas ingurgitadas. A alimentação sanguínea durou cerca de 30 min para todas as condições. Parte das fêmeas foi separada e dissecada no mesmo dia para observação da aparência do intestino e quantificação do sangue ingerido através da quantificação de proteínas com o método do ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), usando albumina sérica bovina como padrão. A outra parte das fêmeas foram mantidas em potes com camada de gesso para postura dos ovos, sendo mantidas com a dieta contendo composto. Contabilizamos a mortalidade das fêmeas durante o período da alimentação açucarada e pós alimentação sanguínea, assim como aspectos relacionados à oviposição como a quantidade de ovos, fecundidade (ovos/fêmea) e fertilidade (se os ovos eclodiram ou não). O número de ovos postos foi quantificado através de contagem visual de foto tirada em estereoscópio (Carl Zeiss – Stemi DV4, Werk Gottingen, Germany) com auxílio de ferramentas de edição e aumento da imagem (zoom) como photoscape (v3.7) e também com o aplicativo imageJ (1.53e). Nessa ferramenta a mesma imagem passava por um processo de edição (conversão em 8-bit, ajuste de *threshold*, escala de preto e branco, seleção da área de interesse e análise das partículas) conforme indicação do programa. A partir desses dois valores foi feita uma média com desvio padrão da média. Esse ensaio foi repetido 3-5 vezes e foi adaptado conforme Moraes e colaboradores (Moraes et al., 2018). As cinco réplicas foram feitas para os compostos L6 e P8, sendo preciso aumentar o número

inicial de fêmeas por réplica de 30 (réplica 1) para 50 em média (réplicas 2-5) em L6. O controle (sacarose) e P8 tiveram 30 fêmeas em média (5 réplicas).

d) Efeito de compostos sobre a infecção de *L. longipalpis* com *Leishmania*

Os compostos mais promissores, LQB-475 (L2), LQ-03 (L7), Pentamidina (P9), e DMSO (solvente), foram testados sobre a infecção de *L. longipalpis* em *Leishmania amazonensis*.

Para as infecções, cerca de 200 fêmeas com 1-2 dias após emergência foram separadas em gaiolas de tecido e mantidas com dieta controle (sacarose) ou teste (sacarose mais composto) por 2 dias para realização da alimentação infectante.

Para infecção com *L. amazonensis*, o processo simula uma infecção natural, no qual as fêmeas de flebotomíneos se alimentam diretamente das patas lesionadas de camundongos tipo Balb/c. Para isso, fizemos um furo na gaiola para passagem da pata infectada e o camundongo anestesiado (xilazin/ cetamin) foi posicionado sobre um plástico de modo que as fêmeas só tiveram acesso à pata que atravessou a passagem feita na gaiola. Os camundongos foram infectados com 12 a 16 semanas de idade através de injeção direta contendo 2×10^6 parasitos/ mL de *L. amazonensis* (cepa JOSEFA). Somente após 70 dias de infecção do camundongo realizamos a infecção dos insetos, quando as patas estavam bastante lesionadas e com alta carga parasitária. A alimentação sanguínea teve duração de 1h e 15min, aproximadamente. Cada gaiola continha 2 camundongos, e o experimento foi feito em duplicata. Após a alimentação, os camundongos foram retirados da gaiola, e eutanasiados em seguida, e os insetos foram mantidos sob alimentação açucarada de acordo com as instruções acima.

Os resultados foram analisados por dissecação, observação da presença de parasitos no intestino, contagem dos parasitos em hemocítmetro e as amostras intestinais foram divididas e congeladas a -20°C em tampão PBS para posterior quantificação da carga parasitaria por qPCR (Ferreira et al., 2018; Pita-Pereira et al., 2005).

Amostras foram coletadas no 3^o, 5^o e 7^o dias pós alimentação sanguínea de acordo os estágios de evolução da infecção de *L. amazonensis*.

e) Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism (versão 6) para Windows. Para verificar distribuição de normalidade dos dados usamos o teste de D'Agostinho & Pearson. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste t não pareado ou Análise de Variância (ANOVA One-way) com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados com distribuição não normal foram analisados usando teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Todas as comparações com valor de $p < 0,05$ foram classificadas como estatisticamente significativas.

3.3.3. RESULTADOS

a) Efeito de compostos sobre a longevidade de flebotomíneos

Ao adicionar os compostos anti-*Leishmania* à dieta açucarada de flebotomíneos analisamos todas as curvas de longevidade estabelecendo a dieta com sacarose como controle. Vimos que os principais achados foram para L6, que reduziu o tempo médio de vida (TMV) de machos de 17 ± 1 dias para 10 ± 1 ($p < 0,0001$) através do teste de comparações múltiplas de Dunn. Ao comparar as curvas de sobrevivência em pares (controle x teste) pelo teste Log-rank (Mantel-Cox), a redução no TMV permanece para L6 ($p < 0,0001$) e também observamos diferença em P8 para 13 ± 1 dias ($p < 0,001$), DMSO para 15 ± 1 dias ($p < 0,05$) e um aumento no TMV em L7 para 19 ± 2 dias ($p < 0,05$). Vale ressaltar que Controle (sacarose) vs P8 pelo teste de comparações múltiplas de Dunn apresentou valor de $p = 0,1429$, enquanto que os demais apresentaram $p > 0,9999$.

Já para as fêmeas, não identificamos diferenças estatisticamente significativas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Entretanto, ao comparar as curvas Log-rank (Mantel-Cox) observamos uma redução significativa no TMV de L2 em relação ao controle, de 14 ± 1 dias para 11 ± 1 ($p < 0,05$), P8 reduziu também de 14 ± 1 dias para 11 ± 1 ($p < 0,05$) e um incremento no TMV de fêmeas com P9 (pentamidina) de 14 ± 1 dias para 19 ± 1 ($p < 0,01$). A tabela 3.3.2 e as figuras 3.3.1 e 3.3.2 resumem esses resultados.

Tabela 3.3.2 - Tempos médios e medianos de vida de *L. longipalpis* com adição de compostos anti-*Leishmania* à dieta açucarada comparando a dieta controle

	MC	MDMSO	M L2	M L7	M L6	M P8	M P9	M P10
MEDIANA	17	15	19	20	10	13	18	15
MÉDIA ± SEM	17 ±1	15 ±1*	18 ±1	19 ±2*	10 ±1****	13 ±1**	17 ±1	15 ±1
	FC	FDMSO	F L2	F L7	F L6	F P8	F P9	F P10
MEDIANA	12	15	8	12	13	12	19	17
MÉDIA ± SEM	14 ±1	16 ±1	11 ±1*	13 ±1	16 ±1	11 ±1*	19 ±1**	17 ±1

Sendo MC e FC Machos e fêmeas controle, aqueles que se alimentaram apenas da dieta com sacarose. Teste de Comparação entre curvas de sobrevivência log-rank (Mantel-Cox), Machos: MC/MDMSO - $p = 0,034$; MC/L6 - $p < 0,0001$; MC/L7 - $p = 0,036$; MC/P8 - $p = 0,0006$ e Fêmeas: FC/ L7 - $p = 0,014$, FC/P8 - $p = 0,02$ e FC/P9 - $p = 0,0032$. Teste de comparações múltiplas de Dunn MC/L6 - $p < 0,0001$

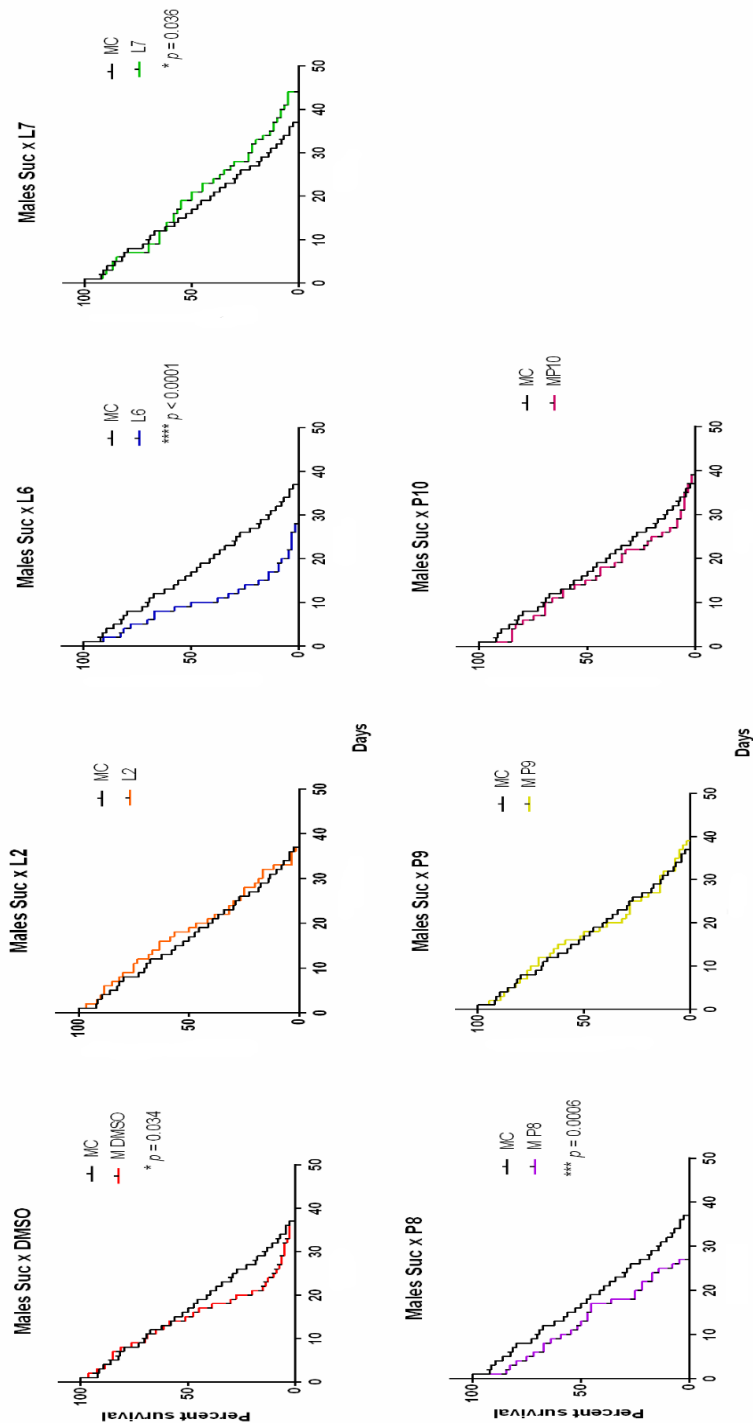


Figura 3.3.1 - Curvas de longevidade de machos de *L. longipalpis* alimentados com solução açucarada mais droga anti-*Leishmania*. Insetos foram mantidos em condições controladas (26°C e umidade 70%) e sua mortalidade verificada diariamente. Teste de Comparação entre curvas de sobrevivência log-rank (Mantel-Cox). Machos: MC/MDMSO - $p < 0,05$; MC/L6 - $p < 0,0001$; MC/L7 - $p < 0,05$; MC/P8 - $p < 0,001$. Teste de comparações múltiplas de Dunn para MC/L6 - $p < 0,0001$. Experimentos realizados 3 vezes independentemente, com $n = 20$ cada.

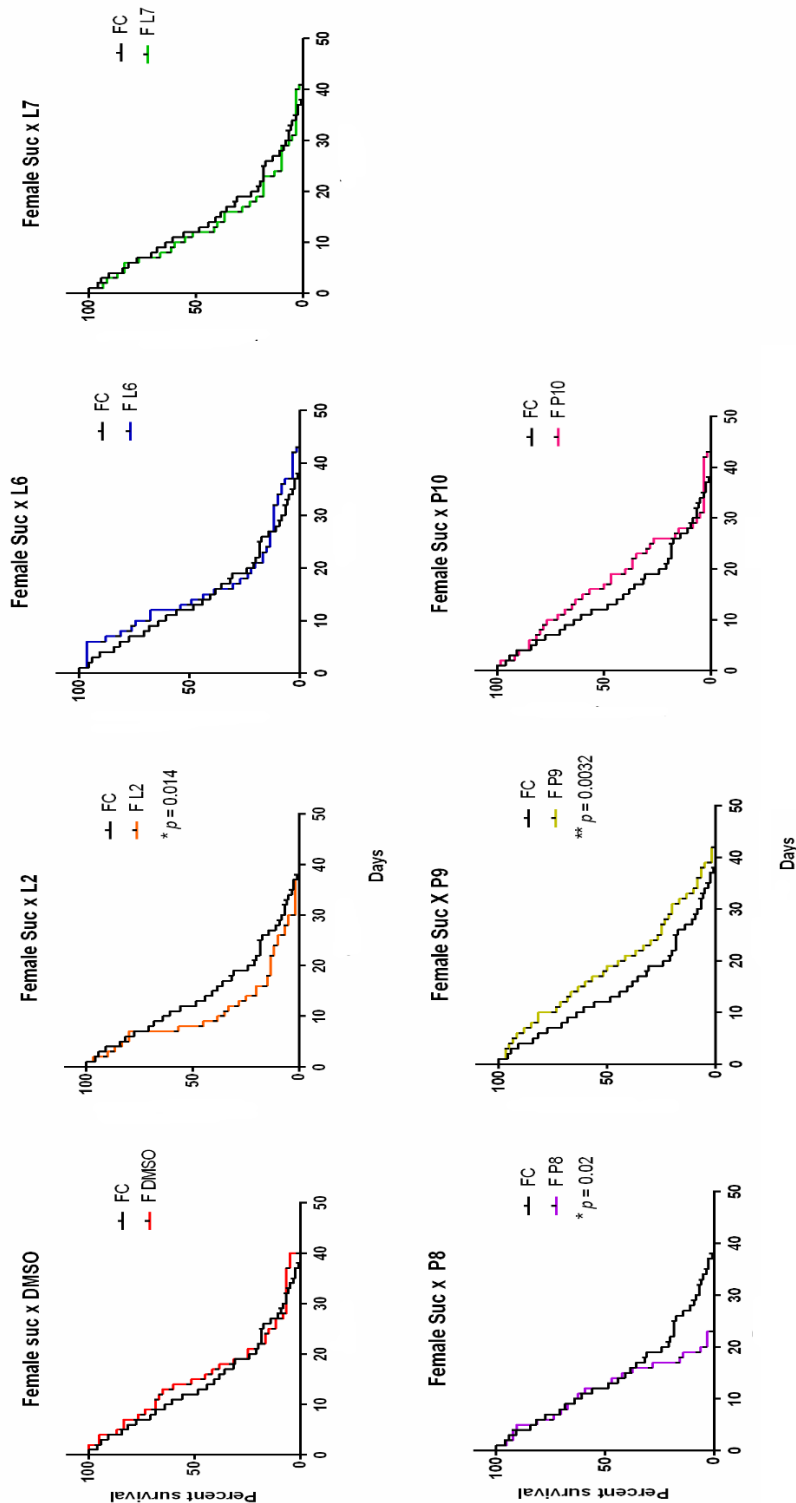


Figura 3.3.2 - Curvas de longevidade de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução açucarada mais droga anti-*Leishmania*. Insetos foram mantidos em condições controladas (26°C e umidade 70%) e sua mortalidade verificada diariamente. Teste de Comparação entre curvas de sobrevivência log-rank (Mantel-Cox) Fêmeas: FC/ L7 - $p = 0,014$, FC/P8 - $p = 0,02$ e FC/P9 - $p = 0,0032$. Experimentos realizados 3 vezes independentemente, com $n = 20$ cada.

b) Efeitos dos compostos sobre alimentação sanguínea e oviposição

Avaliando os efeitos da alimentação açucarada mais compostos antes e pós repasto sanguíneo vemos que o composto L6 causou maior mortalidade de fêmeas e por consequência reduziu o número de insetos disponíveis para realização da alimentação sanguínea (Figura 3.3.3-a). Foi contabilizada a quantidade de fêmeas ingurgitadas e aquelas que não se alimentaram. Esse dado não gerou diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das drogas testadas (Figura 3.3.3-b). Verificamos também possíveis efeitos na sobrevivência das fêmeas após a alimentação sanguínea e após 3 dias não identificamos diferenças na mortalidade comparada aos controles (Figura 3.3.3-c). Com relação à fecundidade das fêmeas (ovos/fêmea), apesar de parecer haver uma redução com L6 e P8, não foram detectadas diferenças nos testes realizados (Figura 3.3.3-d).

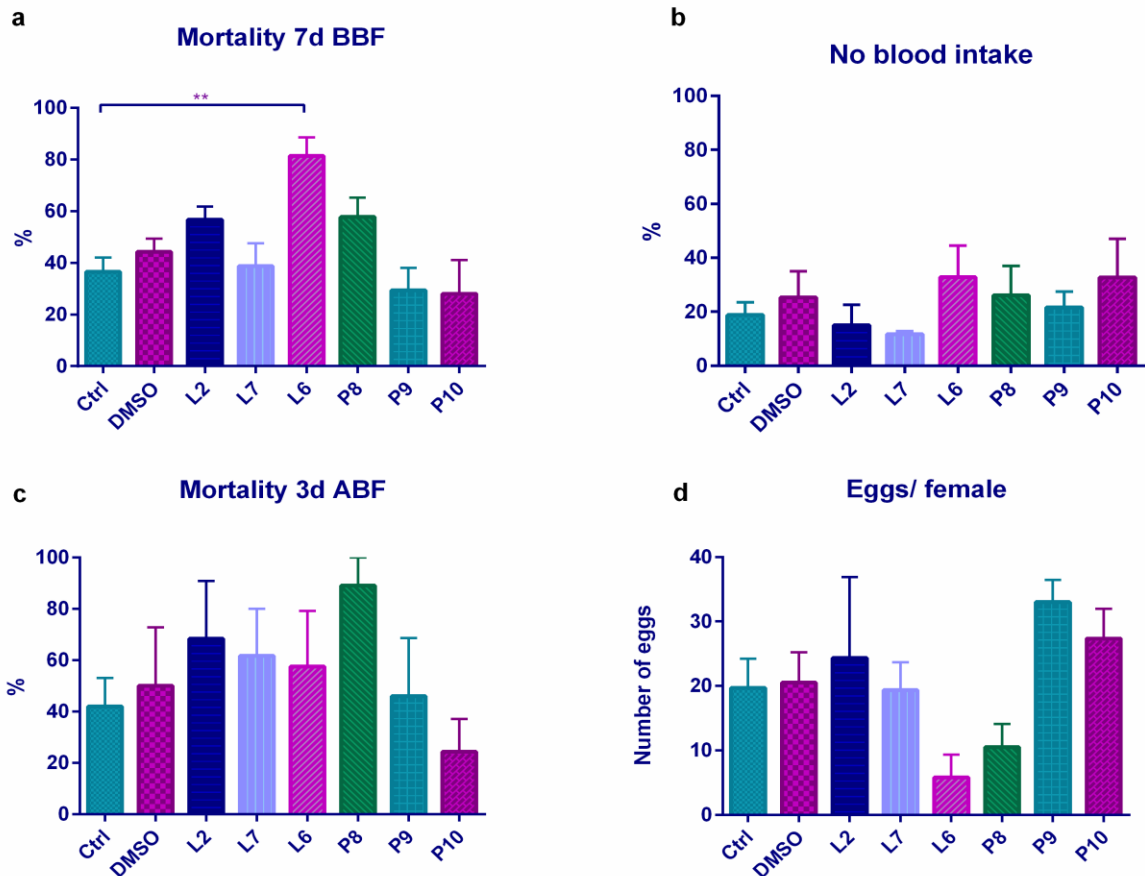


Figura 3.3.3 - Efeito de compostos anti-*Leishmania* adicionados a dieta açucarada em fêmeas de *L. longipalpis* pré e pós alimentação sanguínea. O item (a) apresenta porcentagem de mortalidade pré alimentação sanguínea, sendo o valor de $**p = 0,007$ calculado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, (b) porcentagem de fêmeas que não ingurgitadas, (c) porcentagem de fêmeas mortas até 3 dias pós alimentação sanguínea e (d) taxa de oviposição (ovos/fêmea).

Verificamos também a viabilidade dos ovos observando se haveria eclosão e se essas larvas estariam vivas e ativas. Para esse aspecto foi feita apenas uma análise qualitativa se houve eclosão ou não em cada réplica. O dado sugere que L6 e P8 causam uma diminuição na taxa de eclosão, pois reduziu em 50% e 75%, respectivamente, as chances de geração de larvas viáveis a partir dos ovos postos. A figura 3.3.4 ilustra as porcentagens de eclosão para cada composto.

Vale ressaltar que, das cinco réplicas realizadas para esses compostos (mais controle) em L6, por duas vezes não houve postura de ovos pelas fêmeas, e em uma das vezes não havia número suficiente de fêmeas para oviposição (sendo direcionadas para a dissecação e quantificação de proteínas). Somente em uma de duas repetições experimentais os ovos foram postos e eclodiram dias depois. Ou seja, 36% do total de fêmeas separadas para oviposição não colocaram ovos.

Com P8, das 4 réplicas em que tivemos fêmeas para oviposição, uma não houve postura de ovos, correspondendo a 26%. Nas outras 3 repetições, mesmo havendo postura, só houve eclosão em uma.

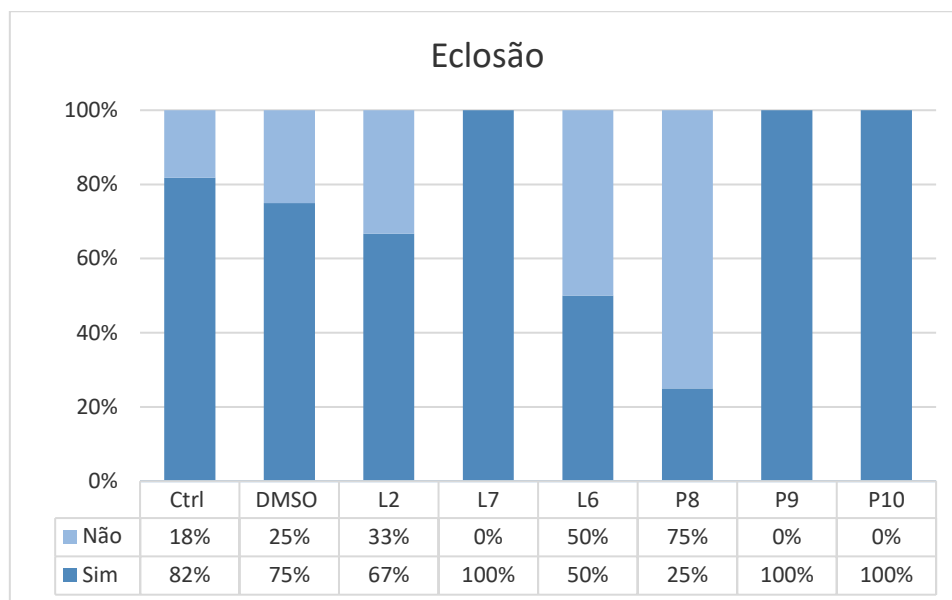


Figura 3.3.4 - Porcentagem de eclosão em grupo de ovos postos, por fêmeas, pós alimentação sanguínea e açucarada contendo drogas antiparasitárias.

Investigamos se a adição prévia desses compostos poderia apresentar efeito inibidor de alimentação sobre o repasto sanguíneo. Para isso fizemos a quantificação das proteínas do conteúdo intestinal de fêmeas ingurgitadas. Os resultados mostram que nenhum dos compostos testados causou redução na quantidade de proteína ingerida através da dieta sanguínea. De fato, L2 aumentou significativamente a quantidade de proteínas de $2,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para $4,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando comparado ao controle

(apenas sacarose). As demais quantidades médias de proteína ingerida pelas fêmeas ficaram entre 2,2 e 3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A figura 3.3.5 mostra o resultado dessas quantificações.

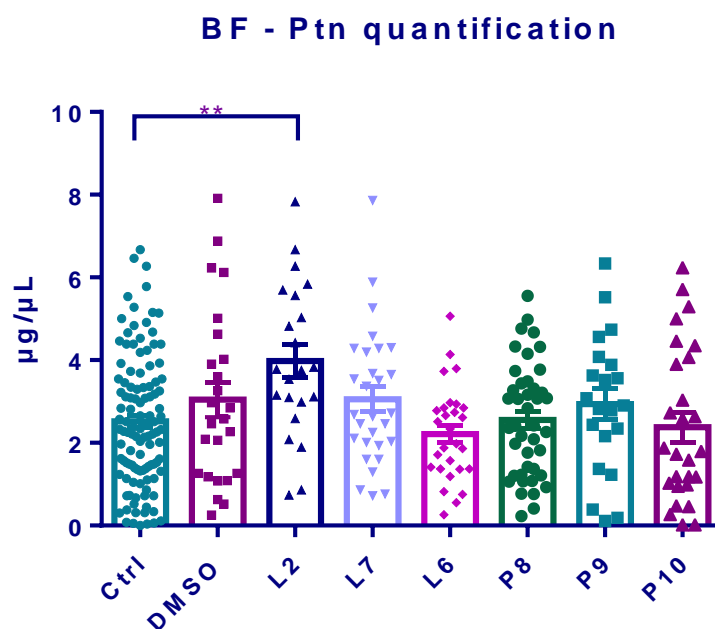


Figura 3.3.5 - Quantificação de proteínas com método BCA do sangue do conteúdo intestinal de fêmeas logo após alimentação sanguínea, alimentadas previamente com solução açucarada mais compostos anti-*Leishmania*. O valor de $**p < 0,01$ foi calculado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn e $***p < 0,001$ pelo teste Mann Whitney (L2 vs Ctrl). Os grupos não assinalados apresentaram comparações com o controle com $p > 0,05$.

c) Efeito de compostos sobre a infecção de *L. longipalpis* com *Leishmania*

Em função dos resultados prévios de Ferreira e cols. (2022) e dos apresentados acima, escolhemos dar continuidade aos testes de infecção com os compostos L2, L7 e P9 (pentamidina), pois esses seriam os compostos com o menor impacto fisiológico nas fêmeas adultas de flebotomíneos. L2 não apresentou efeitos pronunciados na preferência, ingestão ou repulsão (Ferreira et al., 2022). Apesar de afetar a longevidade de fêmeas (Tabela 3.3.1; Figura 3.3.2), essa redução não impede a análise temporal da infecção já que, em contrapartida, essa droga aumentou

a quantidade de sangue ingerido. O composto L7, apesar de ter reduzido o volume ingerido de dieta açucarada comparada ao controle, foi preferido pelas fêmeas e não causou efeitos na longevidade ou em aspectos relacionados à alimentação sanguínea (Ferreira et al., 2022). O composto P9 (pentamidina), apesar de ter tido efeito repulsivo nas fêmeas aumentou seu TMV e não influenciou parâmetros relacionados à alimentação sanguínea. Além disso, foi preferida pelos machos como dieta açucarada (Ferreira et al., 2022).

Os estudos com L6 foram descontinuados por afetar a longevidade das fêmeas antes destas realizarem a alimentação sanguínea (Figura 3.3.3a), o que limita a quantidade de fêmeas para fazer uma alimentação sanguínea infectante com posterior avaliação do curso da infecção. O composto P8 afetou a longevidade de machos e fêmeas (Tabela 3.3.1; Figuras 3.3.1 e .2) e parece ter efeitos mais pronunciados em aspectos relacionados à oviposição, tendo sido também descontinuado.

Das infecções realizadas com *L. amazonensis*, observamos que somente o composto L2 causou redução na quantidade de parasitos por intestino no 3º dia pós infecção (PI) (Figura 3.3.6), entretanto essa diferença não é mais detectada no 5º (Figura 3.3.7) ou 7º dia PI (Figura 3.3.8).

L. amazonensis 3d PI

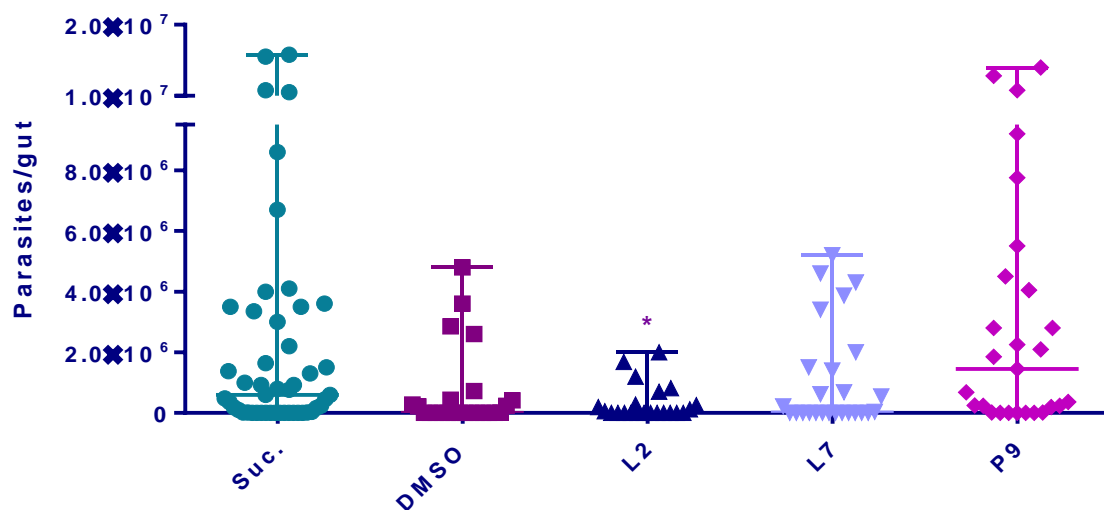


Figura 3.3.6 - Influência de compostos anti-*Leishmania* adicionados à dieta açucarada sobre a infecção de *L. longipalpis* com *L. amazonensis* no 3º dia pós infecção. Diferenças significativas foram investigadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn/ teste Mann Whitney.

L. amazonensis 5d PI

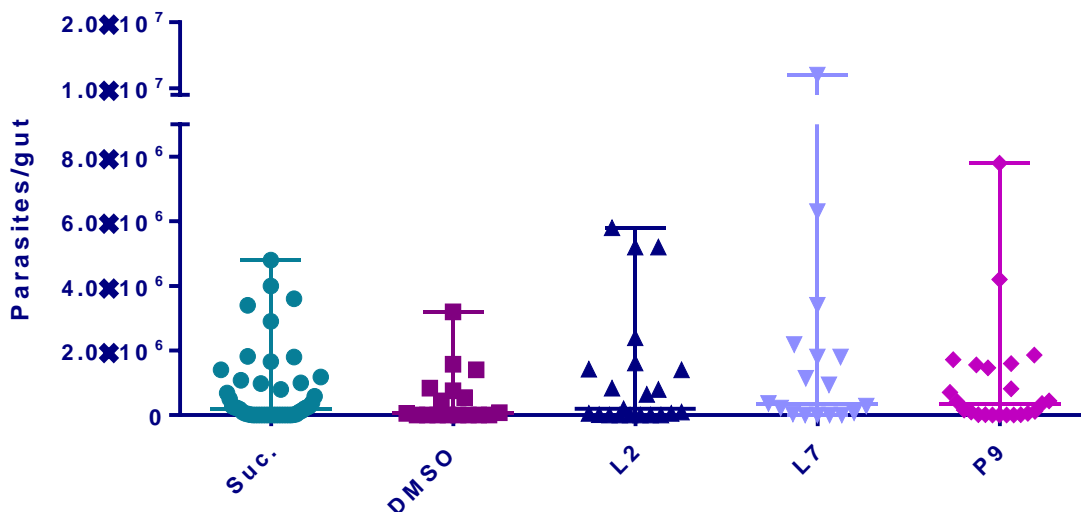


Figura 3.3.7 - Influência de compostos anti-*Leishmania* adicionados à dieta açucarada sobre a infecção de *L. longipalpis* com *L. amazonensis* no 5º dia pós infecção. Diferenças significativas foram investigadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn/ teste Mann Whitney.

L. amazonensis 7d PI

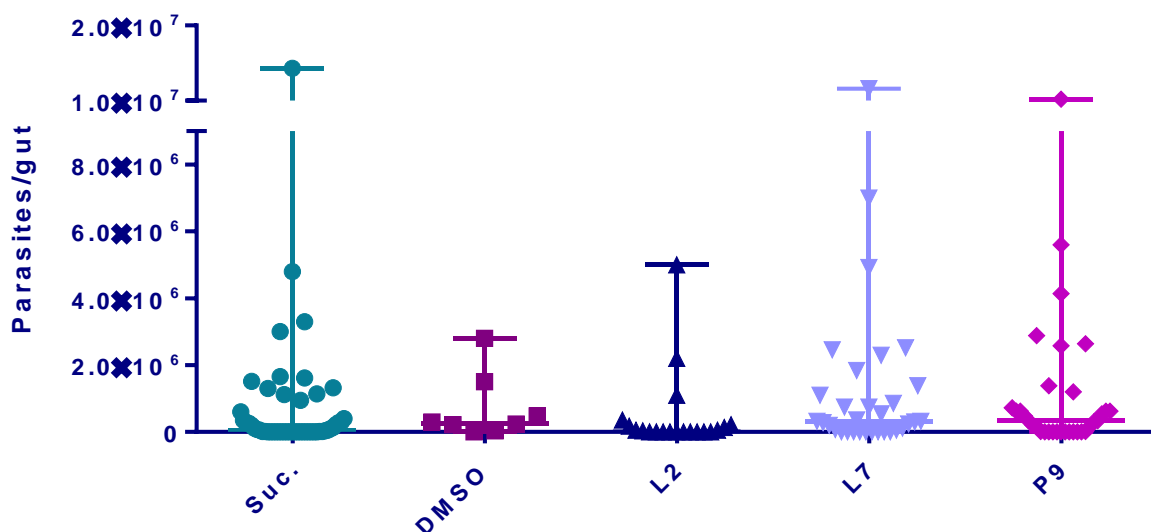


Figura 3.3.8 - Influência de compostos anti-*Leishmania* adicionados à dieta açucarada sobre a infecção de *L. longipalpis* com *L. amazonensis* no 7º dia pós infecção. Diferenças significativas foram investigadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn/ teste Mann Whitney.

Verificamos também a porcentagem de fêmeas infectadas (positivas) contra o total de insetos dissecados nos 3 dias analisados e também não detectamos diferenças entre as dietas controle e experimentais (Tabela 3.3.3).

Tabela 3.3.3 - Porcentagens de fêmeas infectadas com *L. amazonensis* ao longo dos dias pós infecção (PI)

	Ctrl (Sac.)	DMSO	L2	L7	P9
3º d PI	79 ± 7 %	77 ± 3 %	63 ± 16%	56 ± 6%	88 ± 6%
5º d PI	86 ± 7%	58 ± 15%	73 ± 18%	88 ± 13%	83 ± 1%
7º d PI	67 ± 5%	70%	60 ± 0%	82 ± 2%	74 ± 7%

A tabela 3.3.4 resume os resultados obtidos para os compostos descritos nesse trabalho.

Tabela 3.3.4 – Resumo dos efeitos de drogas antiparasitárias sobre a fisiologia de *L. longipalpis*. - : sem alteração significativa em relação aos controles com dieta contendo apenas sacarose. nd – não determinado, ↓ redução ou ↑ aumento do parâmetro analisado.

	DMSO	L2	L6	L7	P8	P9	P10
Longevidade	↓♂	-	↓↓↓♂	↑♂	↓↓♂	-	-
	-	↓♀	-	-	↓♀	↑↑♀	-
Efeitos na AS	-	-	↑↑♀ † Pré AS	-	-	-	-
Eclosão dos ovos	≥ 67%	≥ 67%	50%	≥ 67%	25%	≥ 67%	≥ 67%
Ingestão sanguínea	-	↑↑	-	-	-	-	-
Carga parasitária <i>L. amazonensis</i>	-	↓(3º PI)	nd	-	nd	-	nd
% de infecção	-	-	nd	-	nd	-	nd

3.3.4. DISCUSSÃO

Esse conjunto de resultados descritos traz pela primeira vez os efeitos de drogas com atividade antiparasitária sobre alguns aspectos da fisiologia dos flebotomíneos, o inseto vetor de parasitos do gênero *Leishmania*, adicionando essas substâncias à dieta açucarada.

Um dos aspectos avaliados foi a influência sobre a longevidade e os resultados nos mostram que, dos seis compostos avaliados incluindo o solvente (DMSO), quatro deles tiveram efeitos sobre os machos, sendo L6, P8 e DMSO causadores de redução no TMV com maior ou menor nível de significância e L7, surpreendentemente, gerando um aumento no TMV. Em fêmeas, três drogas apresentaram efeitos na longevidade, sendo L2 e P8 responsáveis pela diminuição do TMV e P9 (pentamidina) pela elevação da longevidade.

Três desses compostos são classificados como pterocarpanoquinonas e um é derivado de hidroxietilpiperazina, o qual exibiu efeito redutor de longevidade em ambos os sexos. Esses resultados são bastante promissores, visto que não estamos utilizando altas concentrações de substâncias (entre 14 e 57 $\mu\text{mol L}^{-1}$) quando avaliamos a possibilidade de adicioná-las em iscas para controle de insetos. Para fins comparativos, ao convertermos as concentrações molares utilizadas da anfotericina B (924,09 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e pentamidina (340,41 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), por exemplo, em concentrações comuns, teremos 20,3 e 19,4 mg/L, respectivamente.

Efeitos larvicidas em *A. aegypti* foram observados com diferentes quinonas de origem natural extraídas da raiz de *Connarus suberosus*, por exemplo, sendo a tectoquinona a substância mais ativa, com LC50 de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ depois de 24 h (Silva et al., 2020). Ainda nesse trabalho os autores relatam que esse composto causou 100% de mortalidade das larvas em até 5 dias nas diferentes concentrações testadas (2,1 $\mu\text{g/mL}$, 3,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,3 $\mu\text{g/mL}$).

Resultados semelhantes foram obtidos em madeira tratada com extratos de naftoquinonas (catalponol e catalponona) de *Catalpa bignonioides* que, além de ser desprezada por cupins quando havia escolha, também reduziu a sobrevivência a zero em 7 dias (Castillo & Rossini, 2010). Castillo & Rossini ainda descrevem uma outra quinona, a jacaranona, que gerou efeito tóxico após a ingestão quando oferecida a moscas como parte de uma dieta açucarada. Eles relatam que as propriedades anti-insetos em extratos de *Bignoniaceae* se deva à grande quantidade de quinonas (especialmente nafto- e antraquinonas) apresentando efeitos inibidores de alimentação ou tóxicos contra várias espécies pertencentes a diferentes ordens de insetos (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera)

(Castillo & Rossini, 2010). Essa informação é corroborada em outras referências (Silva et al., 2020; Sreelatha et al., 2009), que descrevem que quinonas podem apresentar atividade anti-alimentar, gerar dano ao intestino médio pós digestão e até mesmo causar a inibição do complexo mitocondrial III. Esses efeitos podem explicar a razão pela qual a redução na longevidade não é imediata, mas sim um efeito prolongado.

Além disso, tal fato parece estar de acordo com a habilidade das quinonas serem moléculas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ambientes ricos em oxigênio. Essas substâncias podem ainda gerar efeitos anti-alimentares ou tóxicos por sua capacidade de alquilar nutrientes essenciais e componentes celulares (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). Neste trabalho os autores ainda sugerem que quinonas teriam competência de se ligar covalentemente a diversos aminoácidos essenciais *in vitro* (metionina, histidina e lisina). Todavia, esses resultados seriam insuficientes para inferir as consequências fisiológicas dessa ligação em insetos herbívoros (Barbehenn & Peter Constabel, 2011).

Efeitos inibidores de alimentação também foram observados em pterocarpanas extraídas de *Pterocarpus macrocarpus* (Morimoto et al., 2006) e também em ensaios realizados com *Spodoptera litura*, somado a efeito antiparasitário em *L. donovani* (Morimoto et al., 2016) com pterocarpanas análogas aos naturais.

Quanto ao incremento no TMV provocado por L7 em machos, é possível que esteja relacionado ao fato dessa pterocarpanquinona ser uma orto-quinona, e moléculas com essa configuração estão envolvidas no processo de esclerotização e escurecimento de cutícula.

Além de proteínas e quitina, as interações químicas que ocorrem com agentes escurecedores são também responsáveis pelas propriedades físicas do exoesqueleto maduro de insetos. De maneira geral, o processo se dá pela reação de uma proteína ou um aminoácido com um derivado polifenólico secretado na presença de uma oxidase. A dureza e rigidez do tecido envolve a oxidação desses compostos em orto-quinonas, principalmente, seguida de condensação com os grupos NH₂ (possivelmente SH) de proteínas (Bittner, 2006; Sugumaran, 2010). A esclerotização

pode ainda promover o escurecimento da coloração cuticular (cor marrom/preta), o que favorece maior absorção de radiação solar mantendo os insetos aquecidos (Klowden, 2008; Sugumaran, 2010). Entretanto, mais estudos precisariam ser realizados para avaliar se de fato L7 estaria beneficiando a estrutura cuticular de flebotomíneos adultos.

De todos os compostos que causaram redução na longevidade, L6 foi o que gerou efeitos mais significativos em machos. Estruturalmente, diferente dos demais derivados de quinonas, este apresenta um grupo amida ligado a um oxigênio, sugerindo que a presença dessa porção nitrogenada possa estar causando efeitos mais deletérios em machos. É válido mencionar que L6, apesar de não alterar o volume de solução açucarada ingerida, resulta em menor preferência quando há escolha entre dieta controle e experimental (54 vs 33%; Ferreira et al., 2022). Ou seja, embora L6 seja tóxico, no experimento de longevidade os machos se alimentaram da dieta contendo o composto por falta de opção de outra fonte de açúcar.

O composto P8, que é classificado com derivado de hidroxietilpiperazina, foi o único que causou redução no TMV em ambos os sexos e se mostrou promissor para uso como composto inseticida para flebotomíneos. Vale recordar que P8 foi desprezado pelos machos quando havia escolha entre as dietas (Ferreira et al., 2022), e ainda reduziu o volume de solução ingerida quando comparado com a dieta controle. Isso demonstra que ainda que esses machos tenham ingerido um menor volume de solução com P8, já que não tinham outra opção de dieta, foi o suficiente para aumentar a sua mortalidade.

Dados da literatura mostram que compostos sintéticos derivados de piperazina exibem efeitos larvicidas ou inibidores de crescimento na lagarta *Pseudaletia separata* (Walker) (Cai et al., 2010) e atividade inseticida em larvas de mosquito (*Culex pipiens pallens*) em concentrações de 1 mg/L (Xu et al., 2016). Ainda nesse trabalho, os autores descrevem uma atividade inseticida moderada de derivados de piperazina contra os lepidópteros *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* e *Mythimna separata*, em concentrações de 600 mg/L do composto (Xu et al., 2016). Em Aretza e colaboradores (Aretza et al., 2021), drogas sintéticas com porção fenilsulfonil-piperazina apresentaram elevada toxicidade contra larvas de *Aedes aegypti*.

Já os compostos L7 e P9 (pentamidina) causaram aumento no tempo médio de vida de machos e fêmeas, respectivamente. Ao olharmos para os resultados de preferência e ingestão (Ferreira et al., 2022), não detectamos preferência ou maior ingestão em soluções contendo esses compostos. No entanto, P9 foi uma droga que causou efeito repulsivo nas fêmeas (Ferreira et al., 2022), sugerindo que tenha algum odor desagradável. Quando ingerido, pareceu ser palatável, já que nos experimentos de ingestão da dieta açucarada, mesmo não havendo diferença em quantidade ingerida entre as dietas, o volume ingerido de solução com pentamidina (68 ± 10 nL) foi um dos maiores comparado às demais dietas. Esses resultados sugerem que P9 foi benéfico para o *fitness* do inseto.

Esses dados trazem um alerta a respeito da epidemiologia da doença, especialmente os relacionados à pentamidina, que já é um dos fármacos de referência utilizados no tratamento das leishmanioses (Brasil, 2014, 2017). Neste trabalho verificamos a influência desse composto na dieta açucarada, mas seria relevante avaliar se esse aumento na longevidade também ocorreria caso uma fêmea realizasse um repasto sanguíneo em um cão que estivesse sendo tratado com essa droga. Se isso acontecer, essa fêmea potencialmente infectada teria mais tempo de vida de fazer novas alimentações sanguíneas e disseminar o patógeno. Esse cenário ainda reforça a não recomendação de tratamento de cães com as mesmas drogas usadas no tratamento em humanos. Medicamentos como anfotericina B e isotionato de pentamidina parecem ter baixa eficácia no tratamento dos cachorros e elevam o risco de selecionar parasitos resistentes a essas drogas (Brasil, 2014).

Quanto aos possíveis efeitos desses compostos sobre a alimentação sanguínea, vimos que apenas o L6 causou um aumento na mortalidade das fêmeas ao longo do período de alimentação açucarada e pré exposição à cobaia anestesiada. Esse resultado é surpreendente, pois essa substância não havia apresentado efeitos na longevidade de fêmeas previamente. É possível que a diferença entre os resultados derive das diferenças no tempo de observação considerado, pois no experimento de longevidade foram considerados os efeitos de longo prazo (até 40 dias de observação), enquanto que nos testes de alimentação sanguínea os insetos foram

acompanhados apenas por 7 dias. Contudo, os dados da primeira semana das curvas de longevidade não confirmam essa hipótese.

Verificamos que outras diferenças nas condições experimentais entre os experimentos visando os efeitos na alimentação sanguínea e a longevidade seriam a idade dos flebotomíneos (recém emergidos *versus* fêmeas com 1-2 dias pós emergência) e a estação do ano em que as réplicas foram realizadas (outono/ inverno *versus* primavera/verão). Entretanto, não há dados suficientes para sugerir se essas mudanças explicariam esse efeito inseticida.

É válido também ressaltar que o mesmo composto L6, não tendo causado redução estatisticamente significativa na quantidade de ovos/fêmeas (Figura 3.3.3-d), parece influenciar a postura (redução de 36%) e a eclosão dos ovos (redução de 50%). Um racional semelhante vale para P8, que parece afetar mais intensamente a eclosão dos ovos (redução de 75%).

Esses resultados reforçam que L6 e P8 foram os compostos mais deletérios para a fisiologia de flebotomíneos, sugerindo que a digestão ou o direcionamento dos nutrientes para a produção de ovos pode estar sendo afetada. Esses resultados podem ser incorporados a estudos futuros para avaliar se em diferentes concentrações ou desenhos experimentais esses efeitos persistiriam.

Dos resultados de quantidade de proteína ingerida na alimentação sanguínea, somente o composto L2 aumentou os valores médios em 1,6 vezes em relação ao controle. Entretanto, não houve o aumento equivalente esperado na produção de ovos por fêmeas, já que flebotomíneos apresentam concordância gonotrófica (Brazil & Brazil, 2018; Lehane, 2005).

De todo modo, alimentando-se de mais sangue, essas fêmeas estão em teoria adquirindo uma maior quantidade de nutrientes, especialmente aminoácidos, aumentando as chances de sucesso na produção de ovos, já que esse composto não afetou os demais aspectos relacionados à alimentação sanguínea. É possível que tais fêmeas tenham uma necessidade menor de realizar um segundo repasto sanguíneo para reposição de nutrientes, no curto prazo, já que ficaram bastante ingurgitadas (Brazil & Brazil, 2018; Lehane, 2005), hipótese que pode ser explorada no futuro.

O composto L2 também parece não influenciar significativamente na taxa de eclosão. Entretanto, não houve o aumento esperado na produção de ovos por fêmeas. É possível que a quantidade de nutrientes na alimentação sanguínea em nossas condições esteja sendo saturante para os controles, não sendo direcionada para a produção de ovos.

O composto L2 foi a única droga que apresentou redução na carga parasitária de flebotomíneos infectados com *L. amazonensis* no 3º dia pós infecção, no entanto esse efeito não persiste nos demais dias. Essa pouca efetividade não era esperada, já que adicionamos os compostos à dieta açucarada em uma concentração 10 vezes maior que o IC₅₀ calculado para *L. infantum* ou *amazonensis* conforme a tabela 1 (Ferreira et al., 2022). Para L2, usamos o valor da Tabela 1 de IC₅₀ para *L. infantum*, pois era a concentração previamente estabelecida. Contudo, é possível que para L2 tenhamos utilizado uma concentração 35 vezes maior do que o IC₅₀, já que esse valor para *L. amazonensis* relatado na literatura é de $0,40 \pm 0,06 \mu\text{Molar}$ (Faiões et al., 2018).

É possível que esse efeito leishmanicida esteja ocorrendo apenas no 3º dia após a infecção devido a uma maior concentração fisiológica do composto. De acordo com nossas observações experimentais, *L. amazonensis* parece ter um desenvolvimento mais rápido comparado a *L. infantum* em *L. longipalpis*. Dessa forma, espera-se que entre o segundo e quarto dia de infecção tenhamos uma maior quantidade das formas nectomonas (formas longas e móveis) e lectomonas para a primeira espécie (Bates, 2007; Pimenta et al., 2018).

Os flebotomíneos, por sua vez, estocam açúcar em seus divertículos e sua passagem se dá lentamente, possivelmente conforme a necessidade fisiológica do inseto exija o consumo do açúcar (Brazil et al., 1997; Brazil & Brazil, 2018). A alimentação açucarada parece ser mais frequente em fêmeas grávidas ou antes da próxima alimentação de sangue (Takken & Koenraadt, 2013). Assim, é provável que as promastigotas, na forma nectomonas, ao escaparem da matriz e migrarem para região anterior do intestino e cárdia estejam em uma região com maior quantidade de L2 (com açúcar), já que as fêmeas precisariam repor seus níveis energéticos pós digestão sanguínea. É plausível que o efeito antiparasitário seja dependente da forma

evolutiva do parasito, o que pode explicar uma baixa efetividade dos compostos em condições *in vivo*.

Outro fato importante a se mencionar é a quantidade de solução açucarada ingerida contendo o composto. Conforme Ferreira et al. (2022), o volume de solução contendo L2 ingerido pelas fêmeas foi de 41 ± 7 nL, enquanto que para L7 esse volume foi de 27 ± 2 nL, cerca de 1,5 vezes menos. Com isso os parasitos foram expostos a uma concentração menor da droga, explicando a razão do efeito anti-*Leishmania* ter ocorrido apenas em L2 e não em L7. Diferentemente do observado com pentamidina, mesmo as fêmeas possivelmente tendo ingerido volumes próximos a 60 nL.

Esperávamos que os efeitos *in vivo* dessas pterocarpanquinonas fossem mais próximos ao observado *in vitro*, já que apresentam efeitos de inibição de crescimento de promastigotas, alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), fragmentação de DNA em concentrações dose dependentes (≤ 10 μ Molar), aumento da produção de ROS, sendo que o L2 apresentou os menores valores de IC₅₀ para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *braziliensis* e *infantum* comparando com as demais drogas testadas, estando inclusas L1, L3 e L4 (Faiões et al., 2018; Ribeiro et al., 2013; da Silva et al., 2009).

Também não observamos alterações estatisticamente significativas na porcentagem de fêmeas infectadas, mesmo havendo uma pequena redução em L7 no 3º dia pós infecção (23%).

A ausência e a perda de atividade anti-*Leishmania* nas fêmeas de *L. longipalpis* tratadas com os compostos L2, L6 e P9 pode estar relacionada à metabolização desses compostos por parte do inseto. A metabolização de MSP de diversas classes, incluindo quinonas, no intestino de lepidópteros, tem sido documentada (Salminen et al., 2004), e mecanismos de degradação de antraquinonas já foram propostos em cupins (Osbrink et al., 2005). Nesse sentido, seria importante avaliar a possível excreção desses compostos nas fezes e ou na urina, ou mesmo o seu recrutamento em vias catabólicas ou detoxificação por parte do inseto. Uma perspectiva é avaliar a presença ou permanência desses compostos no divertículo das fêmeas, assim como em outros órgãos, para avaliar essa hipótese.

Outro possível mecanismo de inativação da atividade anti-*Leishmania* após ingestão pelos insetos pode ser através da metabolização ou modificação desses compostos por micro-organismos da microbiota intestinal. A ação da microbiota intestinal sobre MSP e sua inativação tem sido bem documentada (Genta et al., 2006), e é possível que os parasitos sejam beneficiados indiretamente por outros micro-organismos. Como esses compostos também podem apresentar ação antimicrobiana, é provável que a ingestão contínua por parte do inseto tenha resultado, por exemplo, na seleção de bactérias resistentes com alta capacidade de metabolizá-los. Dessa maneira, os efeitos sobre a microbiota intestinal também devem ser considerados em estudos futuros.

Outra perspectiva, no sistema estudado, é a própria seleção de parasitos resistentes aos compostos, durante a sua exposição contínua. O ciclo do parasito no inseto é justamente aonde ocorre a troca de material genético entre linhagens, com possível diversificação e seleção de parasitos resistentes (Van Bockstal et al., 2020). Nesse sentido, é possível que a pressão de seleção causada pelos antiparasitários resulte em uma evolução de linhagens resistentes altamente dinâmica no hospedeiro invertebrado.

Em linhas gerais, os resultados observados indicam que a exposição de *Leishmania* a compostos antiparasitários no intestino de flebotomíneos deve considerar uma possível complementaridade metabólica entre parasito, vetor e microbiota. A complexidade desse sistema biológico e a emergência de fenótipos de resistência aos compostos alvo são fatores limitantes da estratégia de bloqueio de transmissão proposta, e devem ser alvo de estudos futuros.

3.3.5. CONCLUSÕES

Podemos concluir a partir desse conjunto de resultados que os compostos L6 e P8 reduziram a longevidade de flebotomíneos adultos e parecem influenciar na eclosão dos ovos, sendo bons candidatos a inseticidas por apresentarem efeito tóxico. Já os compostos L7 e P9 foram benéficos para os insetos e elevaram o tempo de vida de

machos e fêmeas, respectivamente. O composto L2 se mostrou o mais promissor dos compostos testados, por reduzir a longevidade fêmeas de *L. longipalpis* e a carga parasitária de *L. amazonensis* no 3º dia pós infecção. Contudo, os efeitos antiparasitários dos compostos L2, L7 e P9 foram fortemente atenuados no sistema digestório do vetor.

3.4. CAPÍTULO 4

Em fase de finalização de resultados e escrita em formato de artigo

Genes de expressão diferencial, uma alternativa para estimativa de idade para *Lutzomyia longipalpis*

Tainá Neves Ferreira, Caroline da Silva Moraes, Fernando Ariel Genta

3.4.1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos hematófagos amplamente distribuídos no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Apresentam importância médica por serem vetores de patógenos, especialmente parasitos do gênero *Leishmania* transmitidos pela picada das fêmeas durante alimentação sanguínea (Costa & Souza, 2018; OMS, 2022).

Lutzomyia longipalpis é uma das espécies de maior relevância médica nas Américas por ser responsável pelo desenvolvimento e transmissão de *Leishmania infantum*, agente causador da leishmaniose visceral (Brasil 2014, 2017; OPAS, 2019).

As leishmanioses estão listadas como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas causadas por patógenos transmitidos por vetores. Destaca-se pela complexidade de seu ciclo de transmissão, que apresenta uma diversidade de vetores, reservatórios e parasitos (OPAS, 2019; OMS, 2022).

Um aspecto importante na entomologia médica é a estimativa de idade de insetos vetores. Esse dado, além de ser importante para mensurar o impacto desse aspecto no ciclo de transmissão, também é fundamental para avaliar a capacidade vetorial, já que os patógenos possuem um período de incubação extrínseco (PIE). Dessa forma, os insetos precisam ter uma longevidade mínima para disseminar parasitos dos gêneros *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, por exemplo (Lehane, 1985; Ready, 2013; Resh & Cardé, 2009).

Fêmeas de *L. longipalpis* precisam completar cerca de 8 dias de idade para conseguir transmitir os parasitos na sua forma infectiva, pois precisam fazer, pelo menos, duas alimentações sanguíneas, sendo a primeira alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado e uma segunda disseminando as formas metacíclicas já desenvolvidas no intestino das fêmeas, fechando um ciclo de transmissão (Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012; Kamhawi, 2006). Parâmetros como PIE e longevidade compõem um modelo matemático que mensura a capacidade vetorial do inseto. Então, estimar a idade dos insetos é essencial para medir o impacto das estratégias de controle vetorial (Lehane, 1985).

O levantamento de populações de flebotomíneos frequentemente se faz através da técnica de captura-marcação-recaptura (Galati et al., 2009). Porém, essa metodologia não informa a idade, mas a densidade populacional, além de ter sua eficácia afetada por mudanças ambientais.

Quanto a metodologias de estimativa de idade, em flebotomíneos pouco se avançou além das técnicas clássicas, como a análise de crescimento cuticular e desenvolvimento ovariano (Amendt et al., 2021; Lehane, 1985; Vogt & Walker, 1987). No entanto, essas são metodologias laboriosas, que demandam tempo para dissecação de um grande número de amostras, pessoal especializado para avaliar o status de postura, e podem ter baixa acurácia nos resultados (Detinova, 1962; Amendt et al., 2021).

Nos últimos anos, novas técnicas foram descritas para a estimativa de idade em outros insetos vetores, mais especificamente em mosquitos do gênero *Aedes* e *Anopheles*. Por exemplo, com base em mudança de perfis transcricionais, foram descobertos genes biomarcadores de longevidade (Cook et al., 2006; Cook & Sinkins, 2010; Peter e Cook et al., 2007; Hugo et al., 2010; Wang et al., 2013; Zhan et al., 2007).

Essa técnica foi inicialmente desenvolvida avaliando a alteração na expressão de genes idade-dependente em *D. melanogaster*, e apresentou grande acurácia quando comparada com outras estratégias como avaliação de hidrocarbonetos cuticulares (Cook et al., 2006). A partir desse trabalho, foi possível a busca de genes ortólogos em outros modelos como *A. aegypti*, viabilizando a determinação da idade de mosquitos fora das condições de laboratório, mostrando-se uma técnica robusta mesmo em diferentes condições fisiológicas (Caragata et al., 2011).

Assim sendo, neste trabalho buscamos genes de expressão idade-dependentes em *L. longipalpis*, similares aos descritos na literatura. Dessa forma, avaliamos se o perfil transcricional também seria modulado com a idade de flebotomíneos, sendo uma metodologia alternativa para estimar a longevidade desses insetos vetores.

3.4.2. MATERIAL E MÉTODOS

a) Busca de genes similares aos de *A. aegypti* e desenho de primers

Dos quatro genes descritos em *A. aegypti* (Caragata et al., 2011; P. E. Cook et al., 2006; Hugo et al., 2010) (AAEL008844 (id prévia Ae-15848), AAEL003259 (id prévia Ae 8505), AAEL014255 (Aquaporin 6) e AAEL007490) como melhores marcadores de idade por expressão tempo-dependente, foi encontrada similaridade em 3 genes correspondentes de *L. longipalpis*, buscando no banco de sequências do Vectorbase (BLASTN e BLASTX). Foram considerados como similares os genes com maior score e menor *e-value*, além da porcentagem de similaridade. A tabela 3.4.1 resume as informações desses genes.

Tabela 3.4.1 – Genes de *A. aegypti* e seus ortólogos em *L. longipalpis* com expressão idade dependente

Gene				
<i>A. aegypti</i>	<i>L. longipalpis</i>	E-value	Identidade	Suposta função
AAEL008844	LLOJ005905	1E ⁻⁵⁵	71%	Proteína ligante de Cálcio
AAEL003259	LLOJ006193	2E ⁻³⁴	78%	Glicoproteína estrutural de endocutícula
AAEL014255	LLOJ001619	2,00E ⁻⁸⁰	69%	Aquaporina
AAEL007490	—			

Foram usados os programas Primer 3 (Basu & Thornton, 2011) e Beacon designer para escolha dos seguintes primers. LLOJ005905: Forward, 5'-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3', e Reverse, 5'-

GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3'. LLOJ006193: Forward, 5'-
 GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3', e Reverse, '5-
 GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3'. LLOJ001619: Forward, 5'-
 GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3', e Reverse, '5-
 GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3'. Seguiram-se as orientações referente a tamanho dos produtos de PCR, quantidade de bases da sequência de iniciadores, e temperatura de melting atendendo as recomendações da PCR em tempo real descritas (Basu & Thornton, 2011). A tabela 3.5.2 agrupa as informações de parâmetros dos iniciadores. Além desses, foi solicitada também a síntese de primers para os genes constitutivos de *L. longipalpis* RP49 (proteína ribossomal - Forward 5'-GACCGATATGCCAAGCTAAAGCA-3'; Reverse 5' GGGGAGCATGTGGCGTGTCTT 3') e GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – Forward 5'-TTCGCAGAAGACAGTGATGG-3'; Reverse 5'- CCCTTCATCGGTCTGGACTA-3'), conforme descrição em trabalhos prévios (Tinoco-Nunes et al., 2016).

Tabela 3.4.2 – Parâmetros dos iniciadores desenhados para os genes de *L. longipalpis*

ID	Senso (5' - 3')	Antisenso (3'- 5')	Tamanho produto (bp)	Tm °C (S)	ΔG (dímero) senso	Tm°C (AS)	ΔG (dímero) antisenso
LLOJ005905	GATTTGGCTGAC GATGGCAAG	CTTTCATGGCCT GTGGGAATC	112	57,5	-0,4	56,5	-4,4
LLOJ006193	TAGTGATAACGT GACCCCAGTG	ATCAATTCGTGG AACCTGAGCG	148	56,9	-3,3	58,7	-1,1
LLOJ001619	TGTCCAAGTTCT CTGGTGGTTG	GGGATCTCGAT GCTAAACGACA	149	57,8	-1,5	57,7	-3,1

b) Preparo das amostras de flebotomíneos

Aproximadamente 200 fêmeas e machos de *L. longipalpis* adultos recém emergidos foram separados em gaiolas diferentes, e alimentados com solução açucarada (70 % p/v), trocada a cada 2 dias. Cerca de 20 insetos eram retirados ao longo dos dias pós emergência, obtendo amostras flebotomíneos com 1, 3, 8, 10, 15 e 17 dias de idade.

Esses insetos foram utilizados em escaneamentos na região do infravermelho (capítulo 2). Logo após serem escaneados, os insetos eram identificados como machos ou fêmeas e eram colocados individualmente em microtubos de polipropileno de 200 µL contendo 50 µL de RNazol, e mantidos em gelo até serem guardados em freezer -80° C para posterior extração do RNA.

Para avaliar o padrão de expressão nas diferentes idades, realizamos a extração de RNA de pools de 5 flebotomíneos utilizando 250 µL de RNazol total (RNazol® RT Sigma, nº de cat. RN190) seguindo-se as etapas de homogeneização, centrifugação e suspensão conforme as instruções do fabricante. Ressaltando que a degradação de DNA genômico foi realizada com a etapa de adição de 0,6% (1,5 µL) de 4-bromoanísolo seguida de agitação e centrifugação.

A concentração (ng/µL) e a pureza das amostras foram verificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Foram utilizadas apenas amostras com razões de Absorbância 260/280 e 260/230 nm \geq 2. O RNA extraído foi mantido a -80°C até a conversão em cDNA.

As amostras foram usadas para síntese de cDNA usando kit Superscript® III first-strand (Invitrogen – Life Technologies, lote 170198) seguindo as recomendações do protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram quantificadas por fluorescência usando o Qubit (LifeTechnologies) com o kit de ensaio ssDNA (nº de catalogo 10212, molecular probes - Life Technologies) obtendo concentrações de 10-100 ng/µL, procedimento semelhante ao de Vieira e cols. (Vieira et al., 2016; 2020).

c) Padronização das condições da PCR

Para determinar a concentração ideal dos primers foram testadas diferentes concentrações finais do senso e antisenso: 100 nmol L⁻¹, 200 nmol L⁻¹, 600 nmol L⁻¹, 1800 nmol L⁻¹. A concentração mais adequada para amplificação de todos os genes foi de 200 nmol L⁻¹.

Para cálculo de eficiência de primers foram feitas diferentes curvas com concentrações de cDNA indo de 8,0 pg/ µL a 80,0 ng /µL, sendo a concentração de 5 ng/ µL a escolhida para dar continuidade aos experimentos. A curva com fator de diluição 5, de 0,008 a 25 ng /µL, apresentou eficiências próximas de 100% para todos os genes: GAPDH – 101,98%; RP49 – 88,91%; LLOJ005905 – 102,14%; LLOJ001619 – 95,29% e LLOJ006193 – 61,67%.

O protocolo de ciclagem da PCR teve as seguintes etapas: 95°C por 10 min (ativação), 95°C por 15 s, 60°C por 10 s (anelamento e extensão) por 40 ciclos. Como controles negativos foram pipetados poços com mix de reagentes sem cDNA, para avaliar a formação de dímero de primer ou contaminação nas reações. A reação era seguida de uma curva de *melting*: 95° C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 30 s e 60°C por 15 s para confirmar que apenas um único produto foi amplificado para cada alvo.

Para montagem da reação foram preparados mix para cada gene contendo: 12,5 µL de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 0,5 µL de cada primer (senso e antisenso), 9,5 µL de água livre de nuclease mais 2,0 µL de amostra contendo cDNA, (10 ng de cDNA total por reação), com um volume final de 25 µL. As reações de qPCR foram realizadas em um equipamento 7500 FAST (Applied Biosystems) na plataforma de PCR em tempo real do IOC-FIOCRUZ (RPT-09A).

As amostras de insetos com mesma idade correram em 2 poços (duplicata técnica) e as reações foram repetidas 5 vezes com amostras (em pools) de diferentes idades.

Os dados foram analisados com o software Expression Suite v1.0.3 (Life Technologies), considerando a eficiência de amplificação de cada gene alvo

normalizado com os genes de referência RP49 e GAPDH de *L. longipalpis* pelo método comparativo de Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) (Livak e Schmittgen, 2001), avaliando variações a partir das amostras de 0-1 dia. Procedimentos similares encontram-se descritos por Vieira et al. (2016; 2020).

Os dados também foram analisados pelo método *Logcontrast* conforme descrito nos trabalhos realizados em mosquitos de Caragata et al. (2011), Cook et al. (2006, 2007), Hugo et al. (2010), Weeraratne et al. (2021), que trazem a seguinte expressão:

Log contraste $X_i = \log_{10} \left(\frac{X_i/X_{total}}{X_{ref}/X_{total}} \right)$, sendo que:

X_i é o valor médio de Ct de um gene alvo, X_{ref} é o Ct médio do gene de referência (RP49 ou GAPDH) e X_{total} é a soma dos valores de Ct para todos os genes de um indivíduo.

d) Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6 para Windows usando teste Mann-Whitney. As análises estatísticas entre os grupos estão apresentadas nas respectivas figuras e legendas, sendo considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3.4.3. RESULTADOS

Foi possível estabelecer condições padronizadas para os genes LLOJ005905 e LLOJ001619 (Aquaporina 6) (ver detalhes em Materiais e Métodos). Contudo, para o gene LLOJ006193 observamos a necessidade de altas concentrações de primers e cDNA (acima de 2,5 ng/ μ L) para amplificação. Além disso, observamos baixa reprodutibilidade entre as replicatas técnicas e experimentais, bem como curvas de primers com baixa eficiência (em torno de 60%), o que poderia aumentar as chances de anelamentos não específicos como formação de dímeros, por exemplo. Por essas razões, a avaliação das amostras de flebotomíneos de diferentes idades foi continuada apenas com os genes LLOJ005905 e LLOJ001619.

A partir da análise desses alvos verificamos que, em fêmeas, os genes LLOJ005905 e LLOJ001619 têm seu valor de Δ Ct aumentado ao longo dos dias. Isso representa uma redução significativa no nível de expressão relativa com a idade, comparando insetos com 1 dia com os de 8, 10, 15 e 17 dias de idade (Figura 3.4.1). O gene LLOJ005905 tem sua expressão reduzida em cerca de 7 vezes (3,5 para 0,5) enquanto LLOJ001619 tem sua expressão reduzida em pouco mais de 1 vez, comparando fêmeas mais velhas contra as mais novas, com 3 dias de idade.

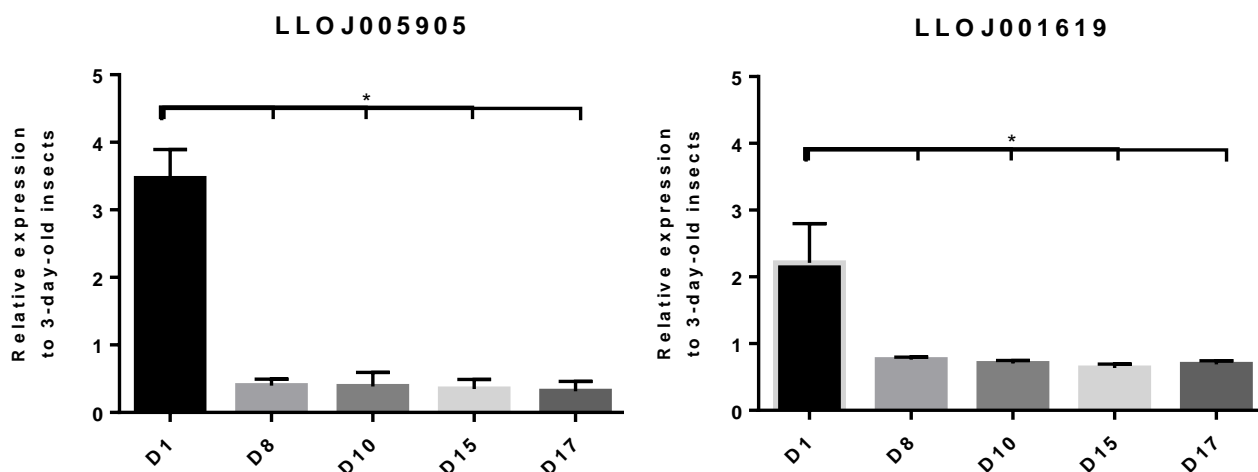


Figura 3.4.1 - Variação dos níveis de expressão gênica para fêmeas de *L. longipalpis* com diferentes idades. À esquerda temos a expressão relativa (RQ - eixo y) versus as diferentes idades (1, 8, 10, 15 e 17 dias pós emergência) para o gene LL001619 e à direita para o gene LL005905, utilizando como referência insetos com 3 dias de idade (expressão relativa igual a 1). As barras representam a média \pm SEM de 4 experimentos independentes e médias de ΔC_T foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$.

Analisando os dados pelo método *Logcontrast* obtivemos quatro curvas logarítmicas para os 2 genes alvos, LL001619 e LL005905, usando os dois genes de referência, RP49 ou GAPDH.

Avaliando o perfil de linearização e o valor de R^2 vemos que as melhores combinações se deram utilizando o gene RP 49 como constitutivo de referência, pois os genes LL005905 e LL001619 apresentaram R^2 de 0,7688 e 0,7571, respectivamente. Usando GAPDH como gene de referência vemos uma tendência linear apenas com o gene LL005905, com $R^2 = 0,614$ (Figura 3.4.2).

O menor valor de contraste log do gene LL005905/ RP49 para *L. longipalpis* [(-0,146)] foi em fêmeas com 1 dia e maior foi em fêmeas com 17 dias (0,077). O mesmo foi observado com gene o LL001619/RP49: o menor valor de log contraste também foi observado em insetos com 1 dia e maior em 17 dias (0,018 e 0,116, respectivamente). É importante salientar que os níveis de expressão são

inversamente proporcionais ao contraste logarítmico dos valores de Ct normalizados/abundância transcricional (Cook et al., 2006), então pode-se dizer que a abundância transcricional dos genes LL005905 e LL001619 aumentou com a idade dos flebotomíneos, indicando que a expressão de ambos os genes diminuiu com a idade.

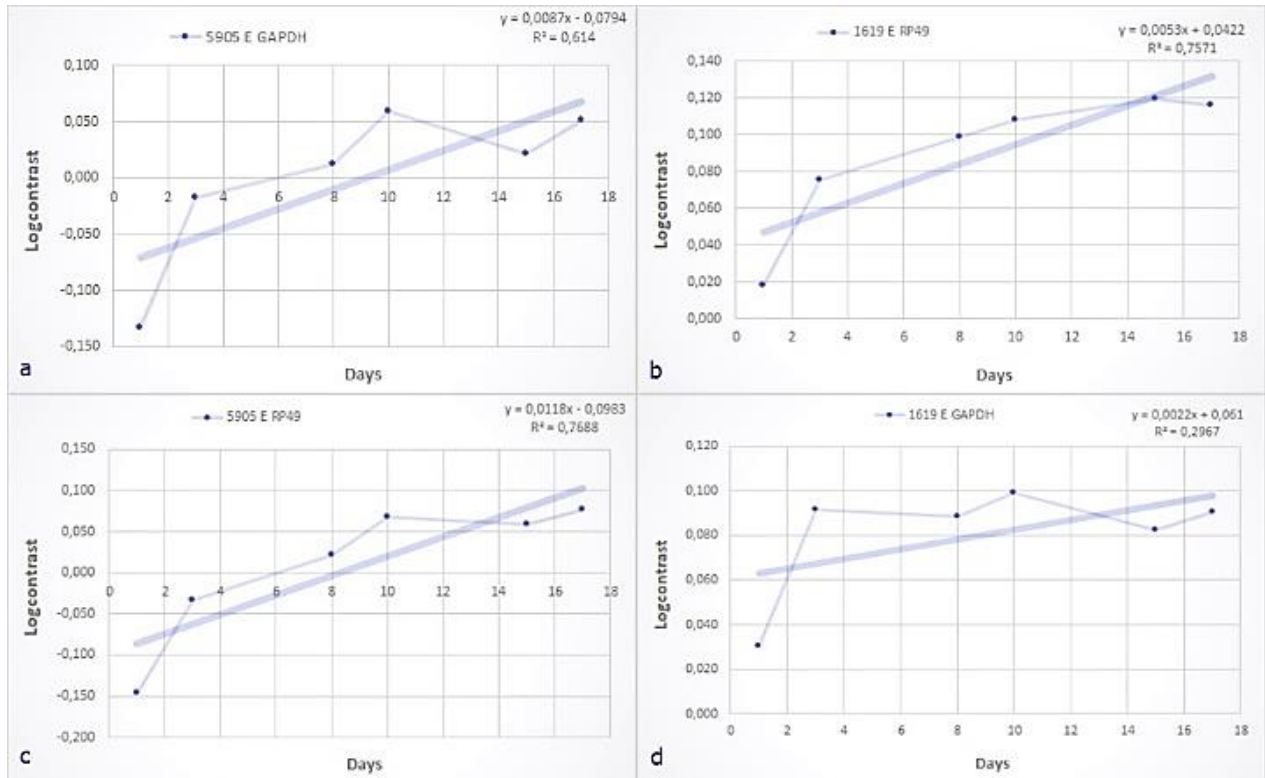


Figura 3.4.2 – Padrão de expressão dos genes LL005905 e LL001619 de *L. longipalpis* em diferentes idades (1, 3, 8, 10, 15, 17 dias) pelo método *Logcontrast* usando como referência GAPDH e RP49. Em (a) LL005905/GAPDH, equação da reta: $y = 0,0087x - 0,0794$ e $R^2 = 0,614$; (b) LL001619/RP49, equação da reta: $y = 0,0053x + 0,0422$ e $R^2 = 0,7571$; (c) LL005905/ RP49, equação da reta: $y = 0,0118x - 0,0983$ e $R^2 = 0,7688$ e (d) LL001619/GAPDH, equação da reta: $y = 0,0022x + 0,061$ e $R^2 = 0,2967$

3.4.4. DISCUSSÃO

Diferentes abordagens vêm sendo aplicadas no desenvolvimento de técnicas para estimativa de idade de insetos vetores, tais como avaliação de desenvolvimento ovariano e mudanças cuticulares, medida de concentração de pteridinas, e detecção de proporção de hidrocarbonetos de cutícula (Amendt et al., 2021; Lehane, 1985). Mais recentemente, com os resultados promissores, tem sido testada a estimativa de idade por espectroscopia no infravermelho próximo (Mayagaya et al., 2009; Milali et al., 2019; Reeves et al., 2010).

Entretanto, esses modelos podem perder a precisão em função das variações de fatores ambientais (umidade e temperatura), assim como das condições fisiológicas do inseto (infecção, estado nutricional, espécies crípticas), podendo ser necessária a revalidação e otimização do método para diferentes populações de um determinado inseto vetor (Cook et al., 2007; Weeraratne et al., 2021).

Neste trabalho, vemos que foi possível construir um modelo preditivo de idade a partir de alteração de padrão de expressão gênica de flebotomíneos, assim como já realizado em outros dípteros (Cook et al., 2006, 2007; Hugo et al., 2010; Weeraratne et al., 2021; Zhan et al., 2007).

A partir dos resultados obtidos vimos que, assim como foi feito em *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* (Cook et al., 2006), também encontramos três dos quatro genes anteriormente descritos como bons marcadores de idade em *L. longipalpis*.

Assim como em *A. aegypti*, foram avaliados diferentes genes de referência com variação mínima de expressão com as diferentes idades para serem usados como normalizadores. Semelhante ao observado em mosquitos, um gene de proteína ribossomal (LL-RP49, correspondente a Ae-RpS17) também foi o mais apropriado para uso como normalizador em *L. longipalpis* (Cook et al., 2006).

Os genes estudados em flebotomíneos demonstraram uma menor expressão ao longo da idade, o que foi identificado pelo método comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$),

tendência que foi reforçada quando analisamos os dados pelo método log contraste. O método $\Delta\Delta Ct$ nos mostra uma menor expressão conforme os insetos envelhecem, mas só nos mostra a taxa usando uma das idades como Ct normalizador (flebotomíneos com 3 dias de idade), o que limita a classificação entre as idades. Através do contraste logarítmico, criamos uma curva modelo sem comprometer os valores de Ct de nenhuma idade, sendo uma alternativa a necessidade de se fazer uma curva padrão de expressão relativa com amostras de idade conhecida

O método log contraste se mostrou mais adequado para a análise de expressão idade-dependente, já que nos forneceu um modelo linear com R^2 próximo a 0,75, estando de acordo com resultados obtidos em mosquitos (Cook et al., 2006; Cook & Sinkins, 2010; Hugo et al., 2010; Weeraratne et al., 2021).

A avaliação de idade por variação no perfil transcricional ainda pode fornecer uma vantagem frente a técnicas como infravermelho, por se mostrar mais estável e robusta mesmo em amostras em diferentes condições fisiológicas como mosquitos infectados, alimentadas com sangue (Caragata et al., 2011), em condições de semi campo (Caragata et al., 2011; Cook et al., 2006; Hugo et al., 2010) ou criados em diferentes temperaturas (Weeraratne et al., 2021), uma vez que a expressão dos genes biomarcadores não teve alterações significativas nesses casos. Entretanto, essa estabilidade de marcadores precisaria ser confirmada com mais estudos em flebotomíneos.

É possível que, agrupando os dados em faixas de idade 1-3 (novos), 8-10 (médios) e 15-17 (velhos), as diferenças na expressão sejam mais visíveis similarmente à separação dos clusters observada por Zhan e cols em *D. melanogaster* (15-20, 30-45 e 60 dias) (Zhan et al., 2007).

3.4.5. CONCLUSÕES

Esses resultados mostram que dois genes de *L. longipalpis*, LL005905 e LL001619, similares aos descritos em outros dípteros, também apresentaram variação no padrão de expressão ao longo da idade dos adultos. A partir dessa metodologia é possível prever a idade de flebotomíneos. Contudo, ainda é necessário testar a robustez da técnica frente a mudanças fisiológicas.

4. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo apresentar resultados de aspectos pouco estudados da biologia básica de flebotomíneos: a influência de drogas anti-*Leishmania* na fisiologia do vetor, avaliação desses compostos como redutores ou bloqueadores de transmissão, e desenvolvimento de técnicas para estimativas de idade de flebotomíneos. Aspectos que compõe sua capacidade vetorial e podem ser úteis em estudos futuros, que visem a elaboração de estratégias de controle vetorial.

O trabalho 1 apresentou os possíveis efeitos repulsivos/atrativos, preferência alimentar e estimulantes ou inibidores de alimentação açucarada.

Dos compostos avaliados em testes de efeitos repulsivos/atrativos, apenas L4 e pentamidina (P9) demonstraram efeitos atrativo e repulsivo, respectivamente.

Uma explicação possível para observamos diferenças estatísticas somente nesses compostos pode ser o maior volume e concentração utilizados nos testes de L4 e P9, comparado aos demais compostos, já que essas quantidades variaram de acordo com o valor de IC₅₀ previamente obtido para *L. amazonensis*. Os demais compostos ou não causam nenhuma alteração perceptiva aos receptores olfativos de flebotomíneos ou estão em concentrações muito baixas para serem detectados.

Os efeitos repulsivos da pentamidina podem ter ocorrido pela presença do grupo amino (-NH₂) próximo a anéis aromáticos, o que pode criar algum odor desagradável para as fêmeas, semelhante a outros compostos derivados de amônia que possuem essa característica (PubChem,2022; Britannica, 2022).

As concentrações utilizadas nesses experimentos foram muito inferiores comparado às concentrações de outros compostos com sabida atividade repelente em insetos. Por exemplo, convertendo a concentração do DEET percentual (15%) e molar chegamos ao valor 0,78 mol/L, enquanto as utilizadas neste trabalho estão na ordem de micromolar.

O DEET é um composto recomendado como repelente para flebotomíneos e mosquitos (Dickens & Bohbot, 2013; Mansueto et al., 2014; Moussa et al., 2015;

Yaghoobi-Ershadi et al., 2006), que teve seu efeito confirmado (controle positivo) quando usado em testes com isca viva, mas o efeito não se mantém quando misturamos o repelente à solução açucarada. O modo de ação do DEET em dípteros ainda não é completamente esclarecido. Segundo dados revisados (Dickens & Bohbot, 2013), esse composto pode modificar ou bloquear as respostas de receptores neuronais atrativos (*olfactory receptor neurons* - ORNs), que normalmente seriam sensíveis a moléculas atrativas, ou ainda que DEET poderia ativar ORNs ou receptores odorantes (ORs) específicos. Isso justifica a necessidade do uso de uma cobaia para melhor avaliação de efeitos atrativos ou repulsivos já que o sistema olfativo de insetos é sensível a componentes emitidos por mamíferos como CO₂ e ácido láctico (Dickens & Bohbot, 2013; Guidobaldi et al., 2014).

Estudos realizados por Hassaballa e colaboradores (2021) com compostos orgânicos voláteis mostraram que flebotomíneos da espécie *P. duboscqi* apresentam uma atração diferencial entre machos e fêmeas, reforçando que variações na quantidade e qualidade de compostos com odor podem alterar a resposta de flebotomíneos (Hassaballa et al., 2021). A atratividade por odores humanos, de frutas e feromônios também foi influenciada por fatores como idade e status pré ou pós acasalamento de machos e fêmeas de outras espécies de dípteros (Devescovi, Hurtado, & Taylor, 2021; Paixão et al., 2015). Possivelmente tais questões estejam influenciando no comportamento de *L. longipalpis*, fato que necessita ser mais profundamente investigado.

Ao avaliar efeitos anti-alimentares em dietas açucaradas contendo os compostos, vemos que as fêmeas foram mais sensíveis às pterocarpanquinonas, quando comparadas aos machos (L1/ L3/L7 vs L4/P8/P10), sugerindo que a tolerância a compostos inibidores de alimentação difere entre os gêneros. Efeitos inibidores de alimentação foram descritos em *Spodoptera litura* (Drijfhout & Morgan, 2010; Sreelatha et al., 2009), assim como um efeito larvicida também em testes com derivados de quinonas (Silva et al., 2020).

O composto P8 apresentou efeito inibidor de alimentação em machos. Os trabalhos que mostram efeitos inseticidas causados por derivados de piperazina descreveram mortalidade em larvas e adultos de mosquitos (Aretza et al., 2021; Xu et al., 2016), o

que estaria de acordo com os efeitos na longevidade de flebotomíneos observados no trabalho 3.

No trabalho de Xu e colaboradores (2016), os autores relatam a importância de heterocíclicos como piridinas, pirazóis, triazol, tiofeno e piperazinas na química médica. Os derivados de piperazina ocupariam um lugar de destaque, por apresentarem diversas propriedades biológicas como antivirais, antibacterianas, antimaláricos e antiparasitárias, como já descrito previamente (Cunico, Gomes, Facchinetti, et al., 2009; Cunico, Gomes, Moreth, et al., 2009; Vasconcelos et al., 2014).

Com relação à escolha entre as dietas, apenas quatro dos compostos testados foram preferidos por machos (P9, P10 (anfotericina)) ou fêmeas (L7, P8). Novamente sugerindo comportamento distinto entre machos e fêmeas para optar por compostos que tenham um odor ou sabor mais agradável.

Os resultados de preferência e ingestão foram bastante coerentes para L1, L3 e L4, que foram desprezados entre as dietas disponíveis e também reduziram o volume de solução ingerido por flebotomíneos. Esse dado poderia criar um viés caso esses compostos fossem testados em demais aspectos como ingestão de sangue ou infecção com *Leishmania*, mas podem ampliar as perspectivas de estudos que avaliem o efeito inibidor de alimentação de derivados de quinonas ou pterocarpanas.

No trabalho 3, seguimos avaliando a influência de alguns dessas drogas antiparasitárias, descontinuando aquelas que foram muito desprezadas e/ ou que causaram efeito anti-alimentar, especialmente nas fêmeas que se alimentam de sangue e são infectadas com *Leishmania*.

Avaliamos se os compostos teriam efeito inseticida e novamente vemos uma diferença de resposta entre os sexos e somente o composto P8 reduziu a longevidade de ambos os sexos, efeito que foi ainda mais significativo em machos. O que foi similar ao observado em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* (Aretza et al., 2021; Xu et al., 2016), conforme já descrito anteriormente. Esse resultado é coerente com os de preferência e ingestão, já que foi preterido e ainda inibiu a alimentação dos

machos, corroborando com os efeitos larvicidas ou inibidores de crescimento em lagartas (*Pseudaletia separata* (Walker)) (CAI et al., 2010).

As pterocapanquinonas que causaram redução no tempo de vida foram L6 (machos) e L2 (fêmeas). Esses resultados estão de acordo com efeitos larvicidas em *A. aegypti* causados por tectoquinona (Silva et al., 2020), e com os efeitos redutores de longevidade e tóxicos pós digestão produzidos por derivados de quinonas em diferentes ordens de insetos (Castillo & Rossini, 2010; Sreelatha et al., 2009).

As quinonas também são potencias geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ambientes ricos em oxigênio e podem ainda gerar efeitos anti-alimentares ou tóxicos por sua capacidade de alquilar nutrientes essenciais e componentes celulares (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). Essas atividades podem explicar o porquê de a redução na longevidade ser um efeito observado a longo prazo.

Avaliando o nível de significância dos compostos com ação redutora de longevidade, podemos sugerir que os machos sejam um pouco mais sensíveis do que as fêmeas, já que a redução no TMV das fêmeas foi de 3 dias (14 para 11 dias), enquanto nos machos P8 reduziu o TMV em 4 dias (17 para 13 dias) e L6 em 7 dias (17 para 10 dias). Um resultado semelhante foi observado com a mandelonitrila (um aglicone – MSP da classe dos glicosídeos cianogênicos), que apresentou um efeito na mortalidade mais intenso em machos (redução de 10 dias) do que em fêmeas (redução de 5 dias) em trabalho anterior (Ferreira et al., 2018).

Assim como em P8, o composto L6, apesar de não reduzido o volume de solução ingerido, também foi desprezado em relação à dieta controle (54 vs 33%). Isso demonstra que, mesmo tendo efeito tóxico para os machos, estes se alimentaram por falta de opção de outra fonte de açúcar nos testes de longevidade.

Já os compostos L7 e P9 aumentaram o TMV de machos e fêmeas, respectivamente. Fato similar foi observado anteriormente também em machos de *L. longipalpis*, em dieta açucarada contendo esculetina (um aglicone – MSP do grupo das cumarinas) (Ferreira et al., 2018).

Esse efeito provocado por L7 em machos pode estar relacionado ao fato dessa pterocarpanquinona ser uma orto-quinona e moléculas com essa configuração

estarem envolvidas no processo de esclerotização e escurecimento de cutícula, o que poderia beneficiar o flebotomíneo ao conferir mais resistência cuticular (Bittner, 2006; Klowden, 2008; Sugumaran, 2010).

A pentamidina (P9) foi o único composto que causou efeito repulsivo nas fêmeas (capítulo 1) sugerindo que tenha algum odor desagradável para esses insetos. Contudo, quando ingerida parece ser bastante palatável, com uma ingestão de 68 ± 10 nL, um dos maiores volumes se comparado às demais dietas. Ao que parece, P9 foi benéfico para as fêmeas. Esse composto traz um dado contrário ao observado em estratégias de controle usadas em malária. Estudos identificaram aumento na mortalidade em mosquitos que se alimentavam de sangue de indivíduos tratados com ivermectina, droga com atividade antiparasitária e usada no tratamento da malária (Chaccour, Lines, & Whitty, 2010). Seria válido avaliar se fêmeas também teriam seu TMV aumentado caso se alimentassem do sangue de pacientes tratados com pentamidina.

Em relação aos possíveis efeitos sobre alimentação sanguínea, vimos que somente o composto L6 causou um aumento na mortalidade das fêmeas durante o período de alimentação açucarada e pré exposição à alimentação sanguínea. Possivelmente estamos observando os efeitos deletérios pós digestão provocados por derivados de quinonas discorridos anteriormente (Barbehenn & Peter Constabel, 2011; Silva et al., 2020; Sreelatha et al., 2009).

Os compostos P8 e L6 parecem afetar a eclosão dos ovos. Esse resultado pode reforçar a hipótese de efeitos deletérios pós digestão, o que estaria afetando o direcionamento de nutrientes para o desenvolvimento dos ovos.

O composto L2, curiosamente, aumentou a quantidade de sangue ingerida pelas fêmeas previamente alimentadas com açúcar, e manteve as taxas de eclosão de ovos em 100%. Entretanto, diferentemente do esperado devido à concordância gonotrófica em flebotomíneos (Brazil & Brazil 2018; Lehane, 2005), não se observou aumento na proporção de ovos por fêmea. Com isso, L2 se mostrou um composto estimulante de alimentação sanguínea e causou uma redução na longevidade de fêmeas quando disponibilizado em dieta açucarada. Isso abre uma perspectiva para a avaliação da

longevidade das fêmeas quando alimentadas da mistura sangue e L2. Se a redução no TMV se confirmar estaríamos diante de um composto com ação semelhante à ivermectina em mosquitos (Chaccour et al., 2010).

Quanto aos efeitos na infecção, L2 foi a única droga que apresentou diminuição na carga parasitária de flebotomíneos infectados com *L. amazonensis* no 3º dia pós infecção. Era esperado que o efeito anti-*Leishmania* fosse mais pronunciado e persistisse ao longo dos dias da infecção.

A provável explicação para esse efeito ocorrer apenas no 3º dia talvez esteja na dinâmica de digestão de açúcares. Flebotomíneos mantêm um estoque de açúcar no divertículo que vai sendo metabolizado por glicosidases conforme a necessidade do inseto (Brazil et al., 1997; Brazil & Brazil, 2018; Soares & Turco, 2003). Então, é possível que as promastigotas que escaparam da matriz e migraram para a região anterior do intestino estejam em uma região com maior quantidade de L2, já que as fêmeas precisariam repor seus níveis energéticos pós digestão sanguínea (Kamhawi, 2006; Takken & Koenraadt, 2013).

Essa possibilidade é reforçada pelo maior volume de solução açucarada contendo L2 (41 ± 7 nL) nos experimentos de ingestão mencionados no trabalho 1 (Ferreira et al., 2022) comparando, por exemplo, à L7 (27 ± 2 nL), que não apresentou redução na carga parasitária em nenhum dos dias pós infecção.

Diante dos efeitos expostos neste trabalho, o composto L2 se mostrou o mais promissor por reduzir o TMV de fêmeas e reduzir a carga parasitária no 3º dia pós infecção com *L. amazonensis*, ficando como perspectiva a repetição dos testes de infecção em doses maiores do composto, já que é difícil estimar a que concentração da droga os parasitos foram expostos.

Um outro objetivo desse trabalho foi buscar formas de estimar a idade de flebotomíneos o que foi realizado através de duas técnicas distintas, por espectroscopia no infravermelho próximo (EIVP) e análise de padrões de expressão gênica, apresentadas nos capítulos 2 e 4.

Por ser uma técnica mais rápida e que exigiu menos etapas de padronização, foi possível obter com a espectroscopia no infravermelho próximo (EIVP) resultados de

diferentes aspectos da biologia de flebotomíneos, como classificação de flebotomíneos em diferentes condições (cópula) e ciclo gonotrófico. Enquanto as análises de idade através de expressão gênica (EG) ficaram em uma fase preliminar de validação de alvos.

Nos resultados de EIVP obtivemos perfis espectrais de flebotomíneos similares a outros insetos com picos de absorção em 1450, 1800 e 1930 nm, que estão associados à presença de água e composição lipídica na cutícula (Aw & Ballard, 2019; Fischnaller et al., 2012; Perez-mendoza et al., 2004).

A redução da taxa de hidratação em flebotomíneos mais velhos também foi um fenômeno observado pelo perfil espectral mostrando sua influência na estimativa de idade de insetos (Mayagaya et al., 2009; Ong et al., 2020).

De maneira geral, vimos que a precisão e acurácia da classificação aumenta quando a diferença de idade dos flebotomíneos é ≥ 8 dias, seja em flebotomíneos que tiveram a oportunidade de acasalar ou não. A exemplo disso, temos o aumento de 71 para 91% de acurácia na análise de fêmeas novas/médias/velhas (1,8 e 15 dias) para novas/velhas (com $<$ ou $>$ de 8 dias) (tabela 2 - capítulo 2). O mesmo ocorre na porcentagem de predições corretas que vão de 80,58 e 87% para 97 e 93%. A mesma tendência foi observada em mosquitos (Mayagaya et al., 2009; Sikulu et al., 2010), culicídeos (Reeves et al., 2010) e moscas (Aw et al., 2012).

A redução na porcentagem de predições corretas de idade, observada principalmente em fêmeas (tabela 1 – parte A / trabalho 2) e machos (tabela 1 – parte A e B / trabalho 2) com 10 dias de idade pode ser explicada pela perda de padrões estruturais, especialmente cuticulares, e bioquímicos ao longo da idade. Isso vai ser refletido na diminuição dos picos principais do espectro (1450, 1800 e 1930 nm), prejudicando a correta classificação das amostras (Amendt et al., 2021; Liebman et al., 2015).

Observamos também que os resultados de previsão e acurácia foram maiores em fêmeas comparando os machos, principalmente nos flebotomíneos que não tiveram a oportunidade de copular. Isso sugere que além do tamanho menor, a cutícula dos machos sofre menos modificações bioquímicas e fisiológicas detectáveis no

infravermelho, já que machos não se alimentam de sangue nem produzem ovos, por exemplo (Mayagaya et al., 2009).

A técnica EIVP se mostrou bastante eficiente na predição de idade de flebotomíneos em condições de laboratório, pois obtivemos porcentagens corretas de predição, entre 83 a 97%, em fêmeas com mais ou menos de 8 dias. Esse dado já indicaria a eficiência de um processo de intervenção em campo com uso de inseticida, pois um composto que aumentasse a mortalidade das fêmeas com 10 dias de idade, por exemplo, e em uma amostragem dessa população que tivesse sua idade estimada por EIVP, o resultado iria prever que a maior parte daquelas fêmeas seriam classificadas como novas (com menos de 8 dias). Isso geraria grande impacto na equação da capacidade vetorial, já que estariam sendo reduzidas tanto a sobrevivência como a densidade vetorial (Resh & Cardé, 2009; Takken & Koenraadt, 2013).

O infravermelho também se mostrou uma excelente metodologia de classificação de flebotomíneos copulados ou não. Esse dado teria grande relevância em estudos de controle de densidade vetorial em áreas endêmicas, pois uma maior classificação de fêmeas copuladas à procura de um hospedeiro vertebrado, indicaria falha na intervenção, já que a quantidade de fêmeas maduras não teria sido reduzida pela intervenção (Detinnova, 1962).

A partir dos resultados do trabalho 4, identificamos dois genes (LL005905 e LL001619) com padrão de expressão idade-dependente em *L. longipalpis*. Esses genes são similares aos descritos para outros dípteros e tiveram menor expressão em insetos de maior idade (Cook et al., 2006, 2007; Hugo et al., 2010; Weeraratne et al., 2021; Zhan et al., 2007).

A redução da expressão foi identificada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mas foi a partir da análise de contraste logarítmico que observamos uma tendência linear a partir da qual podemos extrair parâmetros como equação da reta e R^2 , valor este que foi similar aos modelos descritos para mosquitos (Cook et al., 2006; Cook & Sinkins, 2010; Hugo et al., 2010; Weeraratne et al., 2021).

Fazendo uma comparação entre as técnicas EIVP e expressão gênica, em relação à estimativa de idade, vemos que a primeira é mais vantajosa em termos de preparo de amostra, obtenção de resultados e análise, mas apresenta limitações quanto a taxa de previsões corretas em idades próximas e possíveis variações na precisão e acurácia de amostras de laboratório e campo (Mayagaya et al., 2009; Sikulu et al., 2010).

Nesse sentido, a análise de perfil transcricional pode oferecer uma vantagem por se mostrar mais estável e robusta, mesmo em amostras em diferentes condições fisiológicas como fêmeas infectadas, alimentadas com sangue (Caragata et al., 2011), mosquitos em condições de semi campo (Caragata et al., 2011; Cook et al., 2006; Hugo et al., 2010) ou criados em diferentes temperaturas (Weeraratne et al., 2021), já que a expressão dos genes não mostrou alterações significativas causadas por essas mudanças. Por exemplo, a análise de ciclo gonotrófico/dieta poderia apresentar resultados melhores avaliando a expressão de genes relacionados à oviposição. Contudo, essa robustez de marcadores ainda precisa ser confirmada com mais estudo em flebotomíneos.

Como desvantagem, a quantificação de expressão relativa de marcadores transcricionais demanda mais tempo de preparo da amostra, padronização das condições experimentais (extração de RNA, condições de primers, curva de eficiência e condições da PCR) e maior custo (reagentes e equipamentos).

Isso demonstra que estimar a idade de flebotomíneos não é um processo trivial e fatores como precisão, sensibilidade, tempo e custo/benefício devem ser avaliados antes de se optar por uma das técnicas, já que ambas apresentam aspectos positivos e negativos.

5. PERSPECTIVAS

Verificar o efeito dos compostos L2, L7 e P9 em infecções com *L. infantum* através de sistema de alimentação artificial.

Averiguar o efeito de antibióticos na atividade antiparasitária de L2, L7 e P9 em flebotomíneos infectados com *Leishmania*.

Avaliar a estabilidade dos compostos L2, L7 e P9 nas iscas e após ingestão por fêmeas de flebotomíneos.

Estudar o efeito de L2, L7 e P9 na fisiologia e infecção de flebotomíneos quando adicionados à alimentação sanguínea.

Complementar os resultados de quantificação da carga parasitária de parte das amostras de intestinos infectados através de qPCR.

Validar o modelo de previsão de idade de flebotomíneos através de expressão gênica em amostras com idade conhecida e em diferentes condições fisiológicas.

Padronizar técnicas para quantificação dos compostos ingeridos.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os aspectos descritos nesse trabalho podemos concluir:

- O composto L4 (pterocarpanquinona) e P9 (pentamidina) apresentaram atividades atrativas e repelentes, respectivamente, quando misturados à solução açucarada.
- O DEET confirmou grande atividade repelente em flebotomíneos quando usado em isca animal, mas esse efeito desaparece quando é misturado a solução de açúcar e na ausência de uma isca viva.
- Os compostos L1, L3 e L7 reduziram o volume de solução açucarada ingerido pelas fêmeas e L4, P8 e P10 em machos.
- Os compostos L7 e P8 foram os preferidos pelas fêmeas, P9 (pentamidina) pelos machos e P10 (anfotericina B) por adultos de ambos os sexos, mostrando-se como estimulantes no momento de escolha da dieta açucarada.
- Os compostos L6 e P8 reduziram a longevidade de flebotomíneos adultos e parecem influenciar na eclosão dos ovos, sendo bons candidatos a inseticidas por apresentarem efeito tóxico.
- Os compostos L7 e P9 (pentamidina) foram benéficos para machos e fêmeas de *L. longipalpis*, respectivamente por aumentarem seu tempo médio de vida.
- L2 se mostrou o mais promissor dos compostos testados para uso como inseticida, por reduzir a longevidade fêmeas de *L. longipalpis* e a carga parasitária de *L. amazonensis* no 3º dia pós infecção.
- Vimos que a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo para estimar a idade de flebotomíneos se mostrou bastante precisa e acurada, especialmente na classificação entre insetos jovens (< 8d) e velhos (> 8d) e status de cópula.
- Através da técnica molecular identificamos que *L. longipalpis* possui, ao menos, 2 genes com padrão de expressão idade-dependente, e a partir da padronização desse modelo é possível prever a idade de flebotomíneos em determinadas condições fisiológicas.

7. OUTRAS ATIVIDADES

Publicação dos trabalhos:

Ferreira, T. N., Pita-Pereira, D., Costa, S. G., Brazil, R. P., Moraes, C. S., Díaz-Albiter, H. M., & Genta, F. A. (2018). Transmission blocking sugar baits for the control of *Leishmania* development inside sand flies using environmentally friendly beta-glycosides and their aglycones. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3122-z>

Ferreira, T. N., Barufi, J. B., Horta, P. A., & Castro, D. P. (2021). Beta-1,3-glucanase inhibitors in Brazilian brown seaweed. *An Acad Bras Cienc*, *93*, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191402>

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hamid, Y. M. (2012). Life table characteristics of the female sandfly, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae) under three food regimes. *Journal of Vector Borne Diseases*.
- Abrudan, J., Ramalho-Ortigão, M., O'Neil, S., Stayback, G., Wadsworth, M., Bernard, M., ... McDowell, M. A. (2013). The characterization of the *Phlebotomus papatasi* transcriptome. *Insect Molecular Biology*, 22(2), 211–232. <https://doi.org/10.1111/imb.12015>
- Almeida-amaral EE, (2020). Use of natural products in Leishmaniasis chemotherapy: an overview. *Front Chem* 8:1–43. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.579891>.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amendt, J., Bugelli, V., & Bernhardt, V. (2021). Time Flies—Age Grading of Adult Flies for the Estimation of the Post-Mortem Interval. *Diagnostics*, 11(2), 152. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020152>
- Andrade-Neto, V. V., Cunha-Junior, E. F., Dos Santos Faioes, V., Pereira, T. M., Silva, R. L., Leon, L. L., & Torres-Santos, E. C. (2018). Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, 967–996. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930585>
- Anez, N., Lugo, A., Loaiza, A., Nieves, E., & Orozco, J. (1994). Sugars in the alimentary canal of *Lutzomyia youngi* (Diptera: Phlebotominae). *Medical and Veterinary Entomology*, 8, 38–42.
- Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. (1996). The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2: 145-146.
- Araújo, R. N., De Figueiredo Gontijo, N., Lazzari, C. R., & Pereira, M. H. (2012). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular Interação entre os Insetos Hematófagos e seus Hospedeiros Vertebrados*.
- Aretza, C. D. ., Kharadeb, S. V. ., Chronister, K., Trigueros, R. R., Rodriguez, R. R., Martinez, E. J., & Peter M. Piermarini, Jerod S. Denton, C. R. H. (2021). Further SAR on the (phenylsulfonyl)piperazine scaffold as inhibitors of the *Aedes aegypti* Kir1 (AeKir) channel and larvicides Dr. *ChemMedChem*, 16(2), 319–327. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000598>.Further
- Aw, W. C., & Ballard, J. W. O. (2019). Near-infrared spectroscopy for metabolite quantification and species identification. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1336–1343. <https://doi.org/10.1002/ece3.4847>
- Aw, W. C., Dowell, F. E., William, J., Ballard, O., & Ballard, J. W. O. (2012). Using

- Near-Infrared Spectroscopy to Resolve the Species , Gender , Age , and the Presence of Wolbachia Infection in Laboratory-Reared Drosophila. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2(September), 1057–1065. <https://doi.org/10.1534/g3.112.003103>
- Barbehenn, R. V., & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
- Basu, C., & Thornton, B. (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY EDUCATION*, 39(2), 145–154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Bates, P. A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates, P. A. (2008). Leishmania sand fly interaction : progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>.Leishmania
- Bates, P. A. (2018). Revising Leishmania's life cycle. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- Beran F, Köllner TG, Gershenzon J and Tholl D. (2019). Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytol* 223:52–67.<https://doi.org/10.1111/nph.15718>.
- Berenger, J.-M., & Parola, P. (2017). *Arthropod Vectors of Medical Importance. Infectious Diseases* (Fourth Edi). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00012-5>
- Bittner, S. (2006). When quinones meet amino acids : chemical , physical and biological consequences Review Article. *Amino Acids*, 205–224. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0298-2>
- Boeck, P., Bandeira Falcão, C. A., Leal, P. C., Yunes, R. A., Filho, V. C., Torres-Santos, E. C., & Rossi-Bergmann, B. (2006). Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(5), 1538–1545. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.005>
- Brasil. (2007) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 182 p.
- Brasil. (2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. *Ministério Da Saúde.Secretaria de Vigilância Em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.*, (1ª edição), 78p.

- Brasil. (2014). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. (M. DA SAÚDE, Ed.) (1ª edição). Retrieved from https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
- Brasil. (2017). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*. (Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Ed.) (2ª edição). Retrieved from https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
- Brazil RP, Brazil BG. Binomia. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003; 257-74.
- Brazil, R. P., & Brazil, B. G. (2018). Bionomy : Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. In *Brazilian Sand Flies* (pp. 299–318). https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_5.
- Brazil, R. P., Carneiro, V. L., Filho, J. D. A., Alves, J. C. M., & Falcão, A. L. (1997). Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera:Psychodidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*, 26(April). <https://doi.org/10.1590/S0301-80591997000100026>
- Britannica (2022)._Definição e características de aminas. Acesso em 28 de maio de 2022 e disponível através de <https://www.britannica.com/science/amine#ref277701>.
- Buarque, C. D., Militão, G. C. G. G., Lima, D. J. B. B., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., Odorico, M., ... Costa, P. R. R. R. (2011). Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (Vol. 19, pp. 6885–6891). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.025>
- CAI, M., LI, Z., FAN, F., HUANG, Q., SHAO, X., & SONG, G. (2010). Design and Synthesis of Novel Insecticides Based on the [3- (trifluoromethyl) phenyl] piperazine (PAPP) †. *J. Agric. Food Chem*, 58, 2624–2629. <https://doi.org/10.1021/jf902640u>
- Camila Lorenz, Thiago Salomão Azevedo, & Chiaravalloti-Neto, F. (2019). DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE *Lutzomyia longipalpis* ASSOCIADA A MUDANÇAS CLIMÁTICAS NO BRASIL. *Anais Do XIX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, 1776–1779.
- Capuano, E., & Ruth, S. M. Van. (2016). *Infrared Spectroscopy: Applications. Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00644-9>
- Caragata, E., Johnson, P. H., Leong, Y. S., Ritchie, S. A., Neill, S. L. O., & McGraw, E. A. (2011). Improved accuracy of the transcriptional profiling method of age

- grading in *Aedes aegypti* mosquitoes under laboratory and semi-field cage conditions and in the presence of *Wolbachia* infection, *20*(November 2010), 215–224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01059.x>
- Castillo, L., & Rossini, C. (2010). Bignoniaceae metabolites as semiochemicals. *Molecules*, *15*(10), 7090–7105. <https://doi.org/10.3390/molecules15107090>
- Chaccour, C., Lines, J., & Whitty, C. J. M. (2010). Effect of Ivermectin on *Anopheles gambiae* Mosquitoes Fed on Humans: The Potential of Oral Insecticides in Malaria Control, *202*, 200–203. <https://doi.org/10.1086/653208>
- CHEMSPIDER (2021). Informações sobre Pentamidina. Acesso em 17 de março de 2021 e disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4573.html>.
- Coleman, R. E., Robert, L. L., Roberts, L. W., Glass, J. A., Seeley, D. C., Laughinghouse, A., ... Wirtz, R. A. (1993). Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, *30*(3), 499–502. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.3.499>
- Cook, P. E., Hugo, L. E., Iturbe-Ormaetxe, I., Williams, C. R., Chenoweth, S. F., Ritchie, S. A., ... O'Neill, S. L. (2006). The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(48), 18060–18065. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604875103>
- Cook, P. E., & Sinkins, S. P. (2010). Transcriptional profiling of *Anopheles gambiae* mosquitoes for adult age estimation. *Insect Molecular Biology*, *19*(6), 745–751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01034.x>
- Cook, Peter E, Hugo, L. E., Iturbe-Ormaetxe, I., Williams, C. R., Chenoweth, S. F., Ritchie, S. A., ... O'Neill, S. L. (2007). Predicting the age of mosquitoes using transcriptional profiles. *Nature Protocols*, *2*(11), 2796–2806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.396>
- Costa, L., Pinheiro, R. O., Dutra, P. M. L., Santos, R. F., Cunha-Júnior, E. F., Torres-Santos, E. C., ... Da-Silva, S. A. G. (2014). Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and controls lesions in infected hamsters. *PLoS ONE*, *9*(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109672>
- Costa, W.A., Souza, N.A. (2018). Sand Flies: Medical Importance. In: Rangel, E., Shaw, J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_18.
- Cristina, R., Nava, L., Dominici, P., Manoel, J., Fonseca-alves, C. E., Manuel, J., ... Pereira, F. (2021). Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* to immunosuppressed mice through the bite of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) results in cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, *63*, 1–10.
- Cunha-júnior, E. F., Martins, M., Canto-cavalheiro, M. M., Marques, R., Portari, E. A., Pinto, G., ... Torres-santos, C. (2016). Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral

Leishmaniasis, 60(6), 3794–3801. <https://doi.org/10.1128/AAC.01787-15.Address>

- Cunico, W., Gomes, C. R. B., Facchinetti, V., Moreth, M., Penido, C., Henriques, M. G. M. O., ... de Magalhães, C. S. (2009). Synthesis, antimalarial evaluation and molecular modeling studies of hydroxyethylpiperazines, potential aspartyl protease inhibitors, Part 2. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.03.041>
- Cunico, W., Gomes, C. R. B., Moreth, M., Manhanini, D. P., Figueiredo, I. H., Penido, C., ... Krettli, A. U. (2009). Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(3), 1363–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.04.009>
- da Costa, S. G., Moraes, C. D. S., Bates, P., Dillon, R., & Genta, F. A. (2019). Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia longipalpis* in the absence of sugar feeding. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114(0), 1–6. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180482>
- da Silva, A. J. M., Netto, C. D., Pacienza-Lima, W., Torres-Santos, E. C., Rossi-Bergmann, B., Maurel, S., ... Costa, P. R. R. (2009). Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(1), 176–182. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532009000100026>
- De Souza, N. A., Brazil, R. P., & Araki, A. S. (2017). The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(3), 161–174. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160463>
- Depickère, S., Ravelo-García, A. G., & Lardeux, F. (2020). Chagas disease vectors identification using visible and near-infrared spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 197, 103914. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.103914>
- Detinova TS. 1968. Age Structure of Insect Populations of Medical Importance. *Ann. Rev. Entomol.* 13: 427-450.
- Devescovi, F., Hurtado, J., & Taylor, P. W. (2021). Mating-induced changes in responses of female Queensland fruit fly to male pheromones and fruit: A mechanism for mating-induced sexual inhibition. *Journal of Insect Physiology*, 129, 104195. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104195>
- Diarra, R. A., Traore, M. M., Junnila, A., Traore, S. F., Doumbia, S., Revay, E. E., ... Müller, G. C. (2021). Testing configurations of attractive toxic sugar bait (ATSB) stations in Mali, West Africa, for improving the control of malaria parasite transmission by vector mosquitoes and minimizing their effect on non-target insects. *Malaria Journal*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03704-3>
- Díaz-Albiter, H. M., Ferreira, T. N., Costa, S. G., Rivas, G. B., Gumiel, M., Cavalcante, D. R., ... Genta, F. A. (2016). Everybody loves sugar: First report of plant feeding

- in triatomines. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1401-0>
- Dickens, J. C., & Bohbot, J. D. (2013). Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.006>
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., ... Herrero, L. J. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of Leishmania in Australia q. *IJP: Parasites and Wildlife*, 41(June), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.008>
- Drijfhout, F. P., & Morgan, E. D. (2010). Terrestrial natural products as antifeedants. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 4, 457–501. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00103-9>
- Esperança, Pedro M., Andrew M. Blagborough, Dari F. Da, Floyd E. Dowell, and Thomas S. Churcher. 2018. "Detection of Plasmodium Berghei Infected Anopheles Stephensi Using Near-Infrared Spectroscopy." *BioRxiv*.
- Faiões, V. dos S. D. S., Torres-Santos, E. C., Cunha-Junior, E. F., Da-Silva, S. A. G., Costa, P. R. R., Netto, C. D., ... da Silva, A. J. M. (2018). Second-generation pterocarpanquinones: synthesis and antileishmanial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0174-7>
- Fernandes, W. de S., Borges, L. M., Casaril, A. E., de Oliveira, E. F., Infran, J. de O. M., Piranda, E. M., ... Oliveira, A. G. de. (2017). Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59(December 2016), 1–8. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759054>
- Ferreira, T. N., Brazil, P., Mcdowell, A., Cunha-júnior, E. F., Ribeiro, R., Netto, C. D., ... Ariel, F. (2022). Effects of anti- Leishmania compounds in the behavior of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis, (April). <https://doi.org/10.1002/ps.6900>
- Ferreira, T. N., Pita-Pereira, D., Costa, S. G., Brazil, R. P., Moraes, C. S., Díaz-Albiter, H. M., & Genta, F. A. (2018). Transmission blocking sugar baits for the control of Leishmania development inside sand flies using environmentally friendly beta-glycosides and their aglycones. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3122-z>
- Fiorenzano, J. M., Koehler, P. G., & Xue, R. De. (2017). Attractive toxic sugar bait (ATSB) for control of mosquitoes and its impact on non-target organisms: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph14040398>
- Fischnaller, S., Dowell, F. E., Lusser, A., Schlick-Steiner, B. C., & Steiner, F. M. (2012).

Non-destructive species identification of *Drosophila obscura* and *D. subobscura* (Diptera) using near-infrared spectroscopy. *Fly*, 6(4), 284–289. <https://doi.org/10.4161/fly>

Foley, W. J., McIlwee, I., Lawler, L., Aragonés, P., Woolnough, and N. Berding. (1998). "Ecological Applications of near Infrared Reflectance Spectroscopy a Tool for Rapid, Cost-Effective Prediction of the Composition of Plant and Animal Tissues and Aspects of Animal Performance." *Oecologia* 116(3):293–593305.

Fonseca-Silva, F., Inácio, J. D. F., Canto-Cavalheiro, M. M., & Almeida-Amaral, E. E. (2011). Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>

Francischetti, I. M. B. (2011). Platelet aggregation Inhibitors from Hemetophagous Animals. *Toxicon*, 56(7), 1130–1144. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.003>. Platelet

Fraser, K. J., Mwandigha, L., Traore, S. F., Traore, M. M., Doumbia, S., Junnila, A., ... Müller, G. (2021). Estimating the potential impact of Attractive Targeted Sugar Baits (ATSBs) as a new vector control tool for *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03684-4>

Gaglio, G., Nali, E., Arfuso, F., Abbate, J. M., Giannetto, S., & Brianti, E. (2018). Do Different LED Colours Influence Sand Fly Collection by Light Trap in the Mediterranean? *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/643263>

Galati, E. A. B., Fonseca, M. B., Marassá, A. M., & Bueno, E. F. M. (2009). Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8), 1148–1158. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800012>.

Galati, E.A.B. (2003) Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae, pp 23–51. In: Rangel EF, Lainson R (eds) Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp 368.

Genta, F. A., Blanes, L., Cristofolletti, P. T., do Lago, C. L., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2006). Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.07.007>

Gervazoni LFO, Barcellos GB, F.-P. T. and, & EE, A.-A. (2020). Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy : An Overview, 8(November), 1–43. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.579891>

Gibbs, A. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons : model mixtures and lipid interactions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1(4), 667–672.

Guidobaldi, F., May-Concha, I. J., & Guerenstein, P. G. (2014, April 1). Morphology

- and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *Journal of Physiology Paris*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.006>
- Hall, MH, SM Dutro, and MJ Klowden. (1990). "Determination by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy of Mosquito (Diptera : Culicidae) Bloodmeal Size . PubMed Commons." *J Med Entomol* 27(1):76–79.
- Hamilton, J. G. C., Brazil, R. P., & Maingon, R. (2004). A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 41(6), 1021–1026. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1021>
- Hassaballa, I. B. ., MATOKE-MUHIA, D. ., MASIGA, D. K. ., SOLE, C. L. ., Torto, B., & Tchouassi, D. P. (2021). Behavioural responses of *Phlebotomus duboscqi* to plant-derived volatile organic compounds. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12541>
- Hugo, L. E., Cook, P. E., Johnson, P. H., Rapley, L. P., Kay, B. H., Ryan, P. A., ... Neill, S. L. O. (2010). Field Validation of a Transcriptional Assay for the Prediction of Age of Uncaged *Aedes aegypti* Mosquitoes in Northern Australia, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000608>
- Johnson, Joel B. (2020). "An Overview of Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) for the Detection of Insect Pests in Stored Grains." *Journal of Stored Products Research* 86:101558.
- Johnson, Joel B. and Mani Naiker. (2019). "Seeing Red : A Review of the Use of near Infrared Spectroscopy (NIRS) in Entomology." *Applied Spectroscopy Reviews* 0(0):1–30.
- Junnila, A., Müller, G. C., & Schlein, Y. (2011). Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field. *Journal of Vector Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00132.x>
- Kather, Ricarda and Stephen J. Martin (2012). "Cuticular Hydrocarbon Profiles as a Taxonomic Tool: Advantages, Limitations and Technical Aspects." *Physiological Entomology* 37(1):25–32.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>
- Kessler A and Kalske A, (2018). Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 49:115–138. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062406>.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*, (99), 279–289.
- Kimutai, A., Ngeiywa, M., Mulaa, M., Njagi, P. G. N., Ingonga, J., Nyamwamu, L. B., ... Ngumbi, P. (2017). Repellent effects of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Tagetes minuta* on the sandfly, *Phlebotomus duboscqi*. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2396-0>

- Kinzner, Martin Carl, Herbert C. Wagner, Andrea Peskoller, Karl Moder, Floyd E. Dowell, Wolfgang Arthofer, Birgit C. Schlick-Steiner, and Florian M. Steiner. (2015). "A Near-Infrared Spectroscopy Routine for Unambiguous Identification of Cryptic Ant Species." *PeerJ*(9).
- Klowden, M. J. (2008). Integumentary Systems. In *Physiological Systems in Insects* (2nd ed., pp. 75–135). Idaho, Moscow. <https://doi.org/10.1016/B978-012369493-5.50003-1>.
- Krajacich, Benjamin J., Jacob I. Meyers, Haoues Alout, Roch K. Dabiré, Floyd E. Dowell, and Brian D. Foy. (2017). "Analysis of near Infrared Spectra for Age-Grading of Wild Populations of *Anopheles Gambiae*." 1–13.
- Küçükgülzel, G., & Şenkardeş, S. (2015). Recent advances in bioactive pyrazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.059>.
- Lambert, B., Sikulu-Lord, M. T., Mayagaya, V. S., Devine, G., Dowell, F., & Churcher, T. S. (2018). Monitoring the Age of Mosquito Populations Using Near-Infrared Spectroscopy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22712-z>
- Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E., & Volf, P. (2017). Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017041>
- Lehane, H. J. (1985). Determining the age of an insect. *Parasitology Todayoday*, 1(3), 81–85.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 525–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- Lehane, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. (Vol. 66). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511610493>
- Liebman, K., Swamidoss, I., Vizcaino, L., Lenhart, A., Dowell, F., & Wirtz, R. (2015). The Influence of Diet on the Use of Near-Infrared Spectroscopy to Determine the Age of Female *Aedes aegypti* Mosquitoes The Influence of Diet on the Use of Near-Infrared Spectroscopy to Determine the Age of Female *Aedes aegypti* Mosquitoes, (March). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0790>
- Luiz, J., Melos, R. De, Torres-santos, E. C., Fai, S., Nigris, C. De, Cistia, D., ... Anna, R. S. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*, 103(2).
- MacDonald G (1957) The epidemiology and control of malaria. Oxford University Press, London, UK.
- Marcondes CB (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News*. 118:351–356.
- Maia-Elkhoury, A. N. S., Albuquerque, R., & Salomón, O. D. (2018). Leishmaniasis-

Vector Surveillance and Control in Brazil : A Challenge to Control Programs, 467–494. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1>

- Maia, M. F., Tenywa, F. C., Nelson, H., Kambagha, A., Ashura, A., Bakari, I., ... Bedford, A. (2018). Attractive toxic sugar baits for controlling mosquitoes: A qualitative study in Bagamoyo, Tanzania. *Malaria Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2171-2>
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G., & Cascio, A. (2014). Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.09.007>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health. *Medical and Veterinary Entomology*, 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Marques, M. C. S., Hamerski, L., Garcez, F. R., Tieppo, C., Vasconcelos, M., Torresantos, E. C., ... Silva, W. (2013). In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado, 7(15), 957–962. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.882>
- Mayagaya, V. S., Michel, K., Benedict, M. Q., Killeen, G. F., Wirtz, R. A., Ferguson, H. M., & Dowell, F. E. (2009). Non-destructive determination of age and species of *Anopheles gambiae* s.l. using near-infrared spectroscopy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 622–630. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0192>
- Mellor, H. E., Hamilton, J. G. C., & Anderson, M. (1996). Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 10(4), 371–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00759.x>
- Milali, M. P., Sikulu-Lord, M. T., Kiware, S. S., Dowell, F. E., Corliss, G. F., & Povinelli, R. J. (2019). Age grading *An. gambiae* and *An. arabiensis* using near infrared spectra and artificial neural networks. *PLoS ONE*, 14(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209451>
- Moraes, C. S., Aguiar-Martins, K., Costa, S. G., Bates, P. A., Dillon, R. J., & Genta, F. A. (2018). Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis* : Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and Leishmania Infection . *BioMed Research International*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>
- Morimoto, M., Fukumoto, H., Hiratani, M., Chavasiri, W., & Komai, K. (2006). Insect antifeedants, pterocarpans and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(8), 1864–1868. <https://doi.org/10.1271/bbb.60017>
- Moussa, M. A., Rutledge, L. C., Buescher, M. D., Wirtz, R. A., & Glackin, K. B. (2015). Laboratory Tests of Repellents Against *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae)1. *Journal of Medical Entomology*, 19(2), 176–180.

<https://doi.org/10.1093/jmedent/19.2.176>

- Müller, G. C., Junnila, A., Qualls, W., Revay, E. E., Kline, D. L., Allan, S., ... Xue, R. D. (2010). Control of *Culex quinquefasciatus* in a storm drain system in Florida using attractive toxic sugar baits. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(4), 346–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00876.x>
- Müller, Günter C., Junnila, A., Kravchenko, V. D., Revay, E. E., Butlers, J., & Schlein, Y. (2008). Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1), 150–153. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2008\)24\[150:IPAMAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2008)24[150:IPAMAS]2.0.CO;2)
- Müller, Günter C., & Schlein, Y. (2011). Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Vector Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00113.x>
- Munstermann, L. E. (2019). *Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae)*. *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814043-7.00012-1>
- Neghina, R., & Neghina, A. M. (2010). Leishmaniasis, a global concern for travel medicine. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3109/00365541003789473>.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>
- Netto, C. D., da Silva, A. J. M., Salustiano, E. J. S., Bacelar, T. S., Riça, I. G., Cavalcante, M. C. M., ... Costa, P. R. R. (2010). New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(4), 1610–1616. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.073>
- Oliveira, J. S., Melo, M. N., & Gontijo, N. F. (2000). A Sensitive Method for Assaying Chemotaxic Responses of *Leishmania* Promastigotes. *Experimental Parasitology*, 189, 187–189. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4569>
- Organização Mundial da Saúde. OMS (2022). Leishmaniose. Acesso em 19 de maio de 2022 e disponível através de: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>
- Ong, O. T. W., Kho, E. A., Esperança, P. M., Freebairn, C., Dowell, F. E., Devine, G. J., & Churcher, T. S. (2020). Ability of near-infrared spectroscopy and chemometrics to predict the age of mosquitoes reared under different conditions. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04031-3>
- OPAS. (2019). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Retrieved from http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Organização Pan Americana de Saúde. OPAS (2022). Leishmaniose. Acesso em 19 de maio de 2022 e disponível através de <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>
- Organização Pan Americana de Saúde. OPAS (2021). Leishmaniose, informe português s2019_atualizado.cdr. Acesso em 26 de maio de 2022 e disponível através de <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>
- Osbrink, WLA, Tellez, MR, Kobaisy, M, Lax, AR. 2005. Assessment of Natural Products for Control of Formosan Subterranean Termites. Chapter 6. In: Semiochemicals in Pest and Weed Control; Petroski, R., et al. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. p. 73-87.
- Pasquini, Celio. (2018). "Analytica Chimica Acta Near Infrared Spectroscopy: A Mature Analytical Technique with New Perspectives e A Review." *Analytica Chimica Acta* 1026:8–36.
- Paixão, S., Pereira, I. D. C., Lopes, L., Bottini, A., Vilela, E. F., & Eiras, Á. E. (2015). Volatile semiochemical-conditioned attraction of the male yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, to human hosts. *Journal of Vector Ecology*, 40, 146–151.
- Panahi, E., Shivas, M., Hall-mendelin, S., Kurucz, N., Rudd, P. A., Araujo, R. De, ... Herrero, L. J. (2020). Utilising a novel surveillance system to investigate species of *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) (Diptera : Ceratopogonidae) as the suspected vectors of *Leishmania macropodum* (Kinetoplastida : Trypanosomatidae in the Darwin region of Australia. *IJP: Parasites and Wildlife*, 12(June), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.06.004>
- Peixoto, A. A. franio. (2013). Molecular analysis of an odorant-binding protein gene in two sympatric species of *Lutzomyia longipalpis* s.l. *Mem??Rias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130449>
- Pengelly A, (2004). *The Constituents of Medicinal Plants*. 2nd ed., Routledge, London Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/97811003117964/constituents-medicinal-plantsandrew-pengelly-kerry-bone?msckid=05039db2c7f711ecb875b86cd68988ad>.
- Pépin, J., & Milord, F. (1994). The Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, 33(C), 1–47. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60410-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60410-8)
- Peres LEP, METABOLISMO SECUNDÁRIO. Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, pp. 1–26. (2021). Retrieved from <http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>.
- Perez-Mendoza, A. J., Throne, J. E., Dowell, F. E., James, E., Perez-mendoza, J., Throne, J. E., & Dowell, F. E. (2004). Chronological Age-Grading of Three Species of Stored-Product Beetles by Using Near-Infrared Spectroscopy Chronological Age-Grading of Three Species of Stored-Product Beetles by Using Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 1159–

- Pimenta, Paulo Filemon Paolucci Freitas, V. C. de, & Secundino, N. F. C. (2012). A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores. *Tópicos Avançados Em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Em Entomologia Molecular INCT – EM – 2012*, 1–45.
- Pimenta, P.F.P., de Freitas, V.C., Monteiro, C.C., Pires, A.C.M.A., Secundino, N.F.C. (2018). Biology of the Leishmania–Sand Fly Interaction. In: Rangel, E., Shaw, J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_6
- Pita-pereira, D. De, Roberto, C., Barbosa, M., & Figueiredo, D. (2005). Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay, a Carvalho Britto, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>.
- PUBCHEM (2022). U.S. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology. Informações Pentamidina. Acesso em 28 de maio de 2022 e disponível através de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pentamidine>
- Qualls, W. A., Müller, G. C., Khallaayoune, K., Revay, E. E., Zhioua, E., Kravchenko, V. D., ... Beier, J. C. (2015). Control of sand flies with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in Morocco. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0671-2>
- Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>.
- Rangel, E.F., Lainson, R., Carvalho, B.M., Costa, S.M., Shaw, J.J. (2018). Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: Rangel, E., Shaw, J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_7.
- Ready, P. D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>.
- Reeves, W. K., Peiris, K. H. S., Scholte, E. J., Wirtz, R. A., & Dowell, F. E. (2010). Age-grading the biting midge *Culicoides sonorensis* using near-infrared spectroscopy. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00843.x>
- Rêgo, F. D., & Soares, R. P. (2021). *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector, (April). <https://doi.org/10.1590/0001-37652021XXXX>
- Resh, V. H. ., & Cardé, R. T. (2009). *Enciclopedia of Insects. Second edition* (Vol. 1), 616-619.
- Ribeiro, G. A., Cunha-ju, F., Pinheiro, R. O., Silva, M., Canto-cavalheiro, M. M., Jose,

- A., ... Torres-santos, E. C. (2013). LQB-118 , an orally active pterocarpanquinone , induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*, (January), 789–799. <https://doi.org/10.1093/jac/dks498>
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. and Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463–467.
- Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2007). *Leishmania* Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission. *PLoS Pathogens*, 3(6), 0–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030091>
- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10(6), 1363–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01132.x>
- Roggo, Yves, Pascal Chalus, Lene Maurer, Carmen Lema-Martinez, Aurélie Edmond, and Nadine Jent. (2007). “A Review of near Infrared Spectroscopy and Chemometrics in Pharmaceutical Technologies.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(3 SPEC. ISS.):683–700.
- Sacks, D. ., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 406–411. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.406>
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS. *Annu. Rev. Microbiol.*, (2), 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155913>
- Sacks, D. L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology*, 3(4), 189–196. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x>
- Sádlová, J., & Volf, P. (2009). Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research*, 337(2), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0802-1>
- Saghafipour, A., Vatandoost, H., Zahraei-Ramazani, A. R., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Rassi, Y., Jooshin, M. K., ... Akhavan, A. A. (2017). Control of zoonotic cutaneous leishmaniasis vector, *Phlebotomus papatasi*, using attractive toxic sugar baits (ATSB). *PLoS ONE*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173558>.
- Salminen, JP, Lahtinen, M, Lempa, K, Kapari, L, Haukioja, E, Pihlaja, K. 2004. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: Detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. *Z. Naturforsch.* 59c, 437Ð444.
- Salomón, O. D., Feliciangeli, M. D., Quintana, M. G., Afonso, M. M. D. S., & Rangel,

- E. F. (2015). *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 831–846. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150207>.
- Santos, Lilha M. B., Mathijs Mutsaers, Gabriela A. Garcia, Mariana R. David, Márcio G. Pavan, Martha T. Petersen, Jessica Corrêa-Antônio, Dinair Couto-Lima, Louis Maes, Floyd Dowell, Anton Lord, Maggy Sikulu-Lord, and Rafael Maciel-de-Freitas. (2021). “High Throughput Estimates of Wolbachia, Zika and Chikungunya Infection in *Aedes Aegypti* by near-Infrared Spectroscopy to Improve Arbovirus Surveillance.” *Communications Biology* 4(1).
- Santos, Poliana Macedo, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Marco Aurélio Guerra Pimentel, and Marcelo Martins Sena. 2019. “Non-Destructive Screening Method for Detecting the Presence of Insects in Sorghum Grains Using near Infrared Spectroscopy and Discriminant Analysis.” *Microchemical Journal*, 149(July):104057.
- Schlein, Y. and Jacobson, R. L. (1994). Mortality of *Leishmania* in *Phlebotomus* of the Sand Flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(1), 20–27.
- Schlein, Y. (1993). *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, 9(7), 255–258. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V)
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Messer, G. (1992). *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*, 89(20), 9944–9948. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9944>
- Secundino, F. C., Eger-Mangrich, I., Braga, E. M., Santoro, M. M., & Pimenta, P. (2005). *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *Source: Journal of Medical Entomology*, 42(6), 928–938. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585>
- Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks D (2010) Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol* 12:906–918. PM:20088949.
- Selvam, C., Jordan, B. C., Prakash, S., Mutisya, D., & Thilagavathi, R. (2017). Pterocarpan scaffold: A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 128, 219–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.023>
- Semenza, J. C., & Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: A European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>
- Sen, R., & Chatterjee, M. (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.004>
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., &

- Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, 3(5), 548–555. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>
- Siegwart, M., Bouvier, F., Maugin, S., Lecomte, A., & Lavigne, C. (2015). Differentiating Oriental Fruit Moth and Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae Using Near-Infrared Spectroscopy. *J. Econ. Entomol. HORTICULTURAL ENTOMOLOGY*, 108(1), 219–227. <https://doi.org/10.1093/jee/tou020>.
- Sikulu, M., Killeen, G. F., Hugo, L. E., Ryan, P. A., Dowell, K. M., Wirtz, R. A., ... Dowell, F. E. (2010). Near-infrared spectroscopy as a complementary age grading and species identification tool for African malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-49>.
- Sikulu, M., Dowell, K. M., Hugo, L. E., Wirtz, R. A., Michel, K., Peiris, K. H., ... Dowell, F. E. (2011). Evaluating RNAlater® as a preservative for using near-infrared spectroscopy to predict Anopheles gambiae age and species. *Malaria Journal*, 10(1), 186. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-186>
- Sikulu, Maggy T., Silas Majambere, Bakar O. Khatib, Abdullah S. Ali, Leon E. Hugo, and Floyd E. Dowell. (2014). “Using a Near-Infrared Spectrometer to 735 Estimate the Age of Anopheles Mosquitoes Exposed to Pyrethroids.” 9(3):5-10.
- Sikulu-Lord, M. T., Milali, M. P., Henry, M., Wirtz, R. A., Hugo, L. E., Dowell, F. E., & Devine, G. J. (2016). Near-Infrared Spectroscopy, a Rapid Method for Predicting the Age of Male and Female Wild-Type and Wolbachia Infected Aedes aegypti. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005040>
- Sikulu-Lord MT, Maia MF, Milali MP, Henry M, Mkandawile G, Kho EA, et al. (2016) Rapid and Non-destructive Detection and Identification of Two Strains of Wolbachia in Aedes aegypti by Near- Infrared Spectroscopy. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): e0004759. doi:10.1371/journal.pntd.0004759
- Sikulu-Lord, M. T., Devine, G. J., Hugo, L. E., & Dowell, F. E. (2018). First report on the application of near-infrared spectroscopy to predict the age of Aedes albopictus Skuse. *Scientific Reports*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27998-7>
- Subramanian, A., V. Prabhakar, and The Ohio. (2016). *Analytical Methods: Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis*. Elsevier
- Silva, M. N. da, Ferreira, V. F., & Souza, M. C. B. V. de. (2003). Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. *Química Nova*, 26(3), 407–416. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>
- Silva, R. L., Demarque, D. P., Dusi, R. G., Sousa, J. P. B., Albernaz, L. C., & Espindola, L. S. (2020). Residual Larvicidal Activity of Quinones against Aedes aegypti. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173978>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano,

- M.D., et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1):76-85.
- Smith DL, McKenzie FE. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*. 2004 Jun 4;3:13. doi: 10.1186/1475-2875-3-13. PMID: 15180900; PMCID: PMC449722.
- Soares, M. B. P., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R., Bozza, M., & Bozza, M. (1998). The Vasoactive Peptide Maxadilan from Sand Fly Saliva Inhibits TNF- α and Induces IL-6 by Mouse Macrophages Through Interaction with the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Receptor. *J Immunol*, 160, 1811–1816.
- Soares, R. P. P., & Turco, S. J. (2003). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 75(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007599>
- Sousa, E. T., Lopes, W. A., & De Andrade, J. B. (2016). Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Química Nova*, 39(4), 486–495. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160034>
- Souza, N. A., Vigoder, F. M., Araki, A. S., Ward, R. D., Kyriacou, C. P., & Peixoto, A. A. (2004). Analysis of the Copulatory Courtship Songs of *Lutzomyia longipalpis* in Six Populations from Brazil. *POPULATION BIOLOGY/GENETICS Analysis*, 41(5), 906–913.
- Sreelatha, T., Hymavathi, A., Babu, K. S., Murthy, J. M., Pathipati, U. R., & Rao, J. M. (2009). Synthesis and insect antifeedant activity of plumbagin derivatives with the amino acid moiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6090–6094. <https://doi.org/10.1021/jf901760h>
- Steverding, D. (2017, February 15). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Sugumaran, M. (2010). *Chemistry of Cuticular Sclerotization* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381387-9.00005-1>
- Takken, W., & Koenraadt, C. J. M. (2013). *Ecology of parasite-vector interactions* (Vol. 3).
- Tanaka, A. S., Termignoni, C., Mário, E., & Silva-Neto, A. C. (2012). Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular Anti-Hemostáticos da Saliva e Intestino de Animais Hematófagos: Estrutura e Função.
- Tátilla-Ferreira, A., Garcia, G. A., dos Santos, L. M. B., Pavan, M. G., Carlos, C. J., Victoriano, J. C., ... Maciel-de-Freitas, R. (2021). Near infrared spectroscopy accurately detects *Trypanosoma cruzi* non-destructively in midguts, rectum and excreta samples of *Triatoma infestans*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03465-8>
- Telleria, E., Martins-Da-Silva, A., Tempone, A., & Traub-Cseko, Y. (2018).

- Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10). <https://doi.org/10.1017/S0031182018001014>
- Tinoco-Nunes, B., Telleria, E. L., Da Silva-Neves, M., Marques, C., Azevedo-Brito, D. A., Pitaluga, A. N., & Traub-Csekö, Y. M. (2016). The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1507-4>
- Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., & Nakamura, C. V. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>
- Tiwari, N., Gedda, M. R., Tiwari, V. K., Singh, S. P., & Singh, R. K. (2018). Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(1), 26–41. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105129>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2018). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 5(0), 1–19. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7255.1>
- Valladares, V., Pasquini, C., Thiengo, S. C., Fernandez, M. A., & Mello-Silva, C. C. (2021). Field Application of NIR Spectroscopy for the Discrimination of the Biomphalaria Species That Are Intermediate Hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Frontiers in Public Health*, 9(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.636206>
- Vale, V. F., Moreira, B. H., Moraes, C. S., Pereira, M. H., Genta, F. A., & Gontijo, N. F. (2012). Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis*' larvae (Diptera - Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.005>
- Van Bockstal, L., Hendrickx, S., Maes, L., & Caljon, G. (2020). Sand Fly Studies Predict Transmission Potential of Drug-resistant *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, xx(xx), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.06.006>
- Van Griensven, J., & Diro, E. (2019). Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol. 33, pp. 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- Vasconcelos, M. F. de, Cunha-Júnior, E. F. da, Andrade-Neto, V. V. de, Siqueira, L. M., D'Avila-Levy, C. M., Moreth, M., ... Torres-Santos, E. C. (2014). Oral effectiveness of PMIC4, a novel hydroxyethylpiperazine analogue, in *Leishmania amazonensis*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 210–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.005>
- Vieira, C. S., Waniek, P. J., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C., & Azambuja, P. (2016). Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression

- and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1398-4>
- Vieira, Cecilia Stahl, Figueiredo, M. B., Moraes, C. da S., Pereira, S. B., Dyson, P., Mello, C. B., ... Azambuja, P. (2020). Azadirachtin interferes with basal immunity and microbial homeostasis in the *Rhodnius prolixus* midgut. *Developmental and Comparative Immunology*, 114(September 2020), 103864. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103864>
- Vigoder, F. M., Araki, A. S., Bauzer, L. G. S. R., Souza, N. A., Brazil, R. P., & Peixoto, A. A. (2010). Infection, Genetics and Evolution Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(6), 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.05.004>
- Vigoder FM et al (2015) Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *Parasit Vectors* 8:290–295
- Vigoder, F. M., Araki, A. S., Carvalho, A. B., Brazil, R. P., & Ritchie, M. G. (2020). Dinner and a show: The role of male copulatory courtship song and female blood-feeding in the reproductive success of *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 85(May), 104470. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104470>
- Vogt, W. G., & Walker, J. M. (1987). Influences of temperature, fly size and protein-feeding regime on ovarian development rates in the Australian bush fly, *Musca vetustissima*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101–113.
- Wang, M. H., Marinotti, O., Zhong, D., James, A. A., Walker, E., Guda, T., ... Yan, G. (2013). Gene Expression-Based Biomarkers for *Anopheles gambiae* Age Grading. *PLoS ONE*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069439>
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C., Titus, R. G., Neva, F., Trans, P., & Lond, R. S. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* Sibling Species Differs in Its Composition and Capacity to Enhance Leishmaniasis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 1994, 345, 223–230. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0097>
- Weeraratne, T. C., Karunaratne, S. H. P. P., Reimer, L., Silva, W. A. P. P. De, & Wondji, C. S. (2021). Use of transcriptional age grading technique to determine the chronological age of Sri Lankan *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females. *Parasites & Vectors*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04994-x>
- Wink M, Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* 9:1–9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00364>.
- Xu, G., Yang, X., Jiang, B., Lei, P., Liu, X., Wang, Q., ... Ling, Y. (2016). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and bioactivities of novel piperazine-containing 1,5-Diphenyl-2-penten-1-one analogues from natural product lead. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.088>

- Yaghoobi-Ershadi, M. R., Akhavan, A. A., Jahanifard, E., Vatandoost, H., Amin, G., Moosavi, L., ... Arandian, M. H. (2006). *Repellency Effect of Myrtle Essential Oil and DEET against Phlebotomus papatasi, under Laboratory Conditions. Iranian J Publ Health* (Vol. 35).
- YOUNG, D. C.; DUNCAN, N. A. Guide to the identification and geographic distribution of lutzomyia sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: psychodidae). *Mem. An. Ent. Inst.*, [S. l.], v. 54, p. 1-881, 1994.
- Zhan, M., Yamaza, H., Sun, Y., Sinclair, J., Li, H., & Zou, S. (2007). Temporal and spatial transcriptional profiles of aging in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 17, 1236–1243. <https://doi.org/10.1101/gr.6216607.4>