

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Joanna Lucia de Almeida Alexandre

Avaliação do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e
Leishmania (Leishmania) infantum em *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia*
longipalpis (Diptera: Psychodidae)

RECIFE

2021

Joanna Lucia de Almeida Alexandre

Avaliação do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* em *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

Tese apresentada ao Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadores:

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Dr. Filipe Dantas Torres

Dr. Petr Volf

RECIFE

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães /**

A381a Alexandre, Joanna Lucia de Almeida.
Avaliação do desenvolvimento de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* em *Migonemyia* *migonei* e *Lutzomyia* *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) / Joanna Lucia de Almeida. — Recife: [s.n.], 2021.
89 p. : il., graf., tab., mapas ; 30 cm.

Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientadores: Sinval Pinto Brandão Filho, Filipe Dantas Torres, Petr Volf.

1. Leishmaniose - parasitologia. 2. *Leishmania* - crescimento & desenvolvimento. 3. *Leishmania* *brasiliensis* - crescimento & desenvolvimento. 4. Coinfecção. 5. Psychodidae. 6. Interações Hospedeiro-Parasita. 7. Vetores de Doenças. 8. Insetos Vetores. 9. Suscetibilidade a Doenças - complicações. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Torres, Filipe Dantas. III. Volf, Petr. IV. Título..

CDU 595.771

Joanna Lucia de Almeida Alexandre

**Avaliação do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e
Leishmania (Leishmania) infantum em *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia*
longipalpis (Diptera: Psychodidae)**

Tese apresentada ao Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Aprovada em: 22/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tatiany Patricia Romão Pompilio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. José Dilermando Andrade Filho
Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

À minha mãe, Joceluce, por toda a dedicação, apoio, incentivo, abdicções e,
sobretudo o amor, que é minha fortaleza.

Ao meu pai, Delmirinho, que é meu anjo, e me guarda de onde está.

Aos meus avós, que são meu exemplo de força e determinação.

A Emanuel Vitor, meu amor, companheiro de todos os
momentos, pela paciência, dedicação e amor, que
foram fonte de perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior, por ter permitido e me apoiado em todas as minhas conquistas.

Aos familiares que, de alguma forma, sempre me deram força para seguir em frente.

Ao meu orientador, Dr. Sinval P. Brandão Filho, pelos ensinamentos na vida acadêmica e pela confiança depositada em mim durante minha iniciação científica.

Ao Dr. Petr Volf e toda sua equipe na Charles University em Praga, na República Tcheca, que me deram todo suporte necessário para a realização do estudo.

Ao Dr. Filipe Dantas Torres pelos ensinamentos, sabedoria, dedicação e amizade essenciais ao desenvolvimento de minha tese.

Aos amigos pelo companheirismo, paciência e disposição em me ajudar durante todo esse tempo.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda em todos os momentos que precisei e pelos momentos divertidos.

Aos demais pesquisadores do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, que contribuíram de várias formas para a realização deste trabalho;

Aos amigos da turma do doutorado BBS 2017.1, por cada momento compartilhado. Estar com vocês tornou tudo mais simples e mais feliz.

A coordenação e secretaria do Programa Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, pela dedicação e momentos de aprendizagem dedicados ao longo deste curso.

Ao CNPq por todo apoio financeiro a este trabalho, incluindo a bolsa de doutorado sanduiche.

ALEXANDRE, Joanna Lucia de Almeida. **Avaliação do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* em *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).** 2021. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas importantes e a *Leishmania (Leishmania) infantum* e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* são os mais importantes agentes causadores das leishmanioses nas Américas. Essas duas espécies de parasitas podem co-circular em uma determinada área endêmica, mas suas interações no vetor ainda não foram estudadas. Avaliamos infecções experimentais usando infecções simples e coinfeições para comparar o desenvolvimento de *L. (L.) infantum* (OGVL / mCherry) e *L. (V.) braziliensis* (XB29 / GFP) em *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis*. A marcação de parasitas por diferentes proteínas fluorescentes permitiu estudar a coinfeição e a localização de diferentes espécies de parasitas durante coinfeições. Ambas as espécies de *Leishmania* completaram seu ciclo de vida, produzindo formas infectantes em ambas as espécies estudadas. O mesmo ocorre nas coinfeições, demonstrando que os dois parasitas concluem seu desenvolvimento e não competem entre si. No entanto, as infecções produzidas por *L. (L.) infantum* atingiram taxas mais elevadas e cresceram de forma mais rápida, em comparação com *L. (V.) braziliensis*. Nas infecções do 5^o e 8^o dia pós infecção, *L. (L.) infantum* estava presente em todas as regiões do intestino médio, apresentando tipo de desenvolvimento suprapilariano típico, enquanto *L. (V.) braziliensis* estava concentrada no intestino posterior e abdominal (desenvolvimento peripilar). A partir destes resultados é possível concluir que as duas espécies de flebotomíneos são permissivas ao desenvolvimento concomitante dos dois parasitos e mais susceptíveis ao desenvolvimento de *L. (L.) infantum*. Um achado inédito e importante para saúde pública, contribuindo para uma melhor compreensão do ciclo de transmissão das leishmanioses e da interação parasito-vetor.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania*; Coinfeição; *Lutzomyia (Migonemyia) migonei*, *Lutzomyia longipalpis*, susceptibilidade.

ALEXANDRE, Joanna Lucia de Almeida. **Evaluation of the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum* on *Migonemyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).** 2021. Teses (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Leishmaniasis are important neglected diseases and *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* are the most important causative agents of leishmaniasis in the Americas. These two species of parasites can co-circulate in a specific endemic area, but their interactions with no vectors have not yet been studied. We evaluated experimental changes using simple infections and co-infections to compare the development of *L. (L.) infantum* (OGVL / mCherry) and *L. (V.) braziliensis* (XB29 / GFP) in *Migonemyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. Labeling of parasites by different fluorescent proteins, choosing the co-infection and location of different species of parasites during co-infections. Both *Leishmania* species completed their life cycle, producing infective forms in both species studied. The same occurs in coinfections, demonstrating that the two parasites complete their development and do not compete with each other. However, infections produced by *L. (L.) infantum* reached higher rates and grew faster than *L. (V.) braziliensis*. In the 5th and 8th day post-infection changes, *L. (L.) infantum* was present in all regions of the midgut, such a typical suprapilarian development, while *L. (V.) braziliensis* was concentrated in the hindgut and abdominal (peripillar development). From these results it is possible to conclude that the two species of sandflies are permissive to the concomitant development of the two parasites and more susceptible to the development of *L. (L.) infantum*. An unprecedented and important finding for public health, contributing to a better understanding of the transmission cycle of leishmaniasis and the parasite-vector interaction.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania*; Co-infection; *Lutzomyia (Migonemyia) migonei*, *Lutzomyia longipalpis*, susceptibility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2018	19
Figura 2-	Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar, 2018	19
Figura 3-	Lesão ulcerada - Manifestação clínica clássica da leishmaniose tegumentar	20
Figura 4-	Formas imaturas dos flebotomíneos.....	22
Figura 5-	Fêmea de <i>Pressatia choti</i>	23
Figura 6-	Formas de desenvolvimento da leishmanias.....	24
Figura 7-	Principais formas de desenvolvimento de leishmanias.....	26
Figura 8-	Potes e gaiola utilizados na colônia de flebotomíneos.....	40
Figura 9-	Alimentação artificial dos flebotomíneos.....	42
Quadro 1-	Classificação morfológica de <i>Leishmania</i> spp.	44
Gráfico 1-	Curva de crescimento de <i>Leishmania</i> spp. <i>in vitro</i> a partir de um inóculo inicial de 10^4 promastigotas/ml, experimento 1 e 2.....	45
Gráfico 2-	Curva de crescimento de <i>Leishmania</i> spp. <i>in vitro</i> a partir de inóculo dose inicial de 10^5 promastigotas/ml, experimento 1 e 2....	46
Gráfico 3-	Taxa de infecção de <i>Leishmania</i> spp. em <i>Mg. migonei</i>	47
Figura 10-	Intestino médio torácico com a região da cárdia e válvula do estomodeu de <i>Mg. migonei</i> infectados com <i>L. (L.) infantum</i> , no 5 PI	48
Gráfico 4-	Taxas de intensidade da infecção de <i>Mg. migonei</i>	49
Gráfico 5-	Localização da infecção por <i>Mg. migonei</i>	50
Gráfico 6-	Taxa de infecções de <i>Leishmania</i> spp. em <i>Lu. longipalpis</i>	51
Gráfico 7-	Taxas de intensidade da infecção de <i>Lu. longipalpis</i>	52
Gráfico 8-	Localização da infecção por <i>Lu. longipalpis</i>	53
Figura 11-	Microscopia de fluorescência da cárdia e válvula de estomodeu de fêmea de <i>Lu. longipalpis</i> no dia 8 pós-infecção, co-infectada por <i>L. (V.) braziliensis</i> (fluorescência verde) e <i>L. (L.) infantum</i> (fluorescência vermelha).....	53
Gráfico 9-	Análise morfométrica e classificação morfológica das <i>Leishmania</i> spp.	55
Figura 12-	Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp. durante o desenvolvimento nos flebotomíneos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C-	Grau Celsius
A-	Adenina
BME -	<i>Basement Membrane Extract</i>
BRA-	<i>L. (V.) braziliensis</i>
C-	Citosina
Coinfe.-	Coinfecção
Ct	Cycle threshold
DNA-	Deoxyribonucleic Acid
ENDO-	Espaço endoperitrófico
E.U.A-	Estados Unidos da América
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
fg-	Fentogramas
G-	Guanina
GFP-	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína verde fluorescente)
IMA-	Intestino médio abdominal
IMT-	Intestino médio torácico
IS	Intestino superior
kDNA-	<i>Kinetoplasmic Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA do cinetoplasto)
L.-	<i>Leishmania</i>
L1-	Estádio larval 1
L2-	Estádio larvar 2
L3/L4-	Estádio larval ¾
LONG-	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LGP-	Lipofosfoglicano
LT-	Leishmaniose tegumentar
LV-	Leishmaniose visceral
Lu.-	<i>Lutzomyia</i>
Mg.	<i>Migonemyia</i>
Ny.	<i>Nissomyia</i>
mg-	Miligramas
MIG-	<i>Migonemyia migonei</i>
mL-	Mililitros

MP-	Matriz peritrofica
OMS-	Organização Mundial da Saúde
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PI	Pós-infecção
<i>Pr.</i>	<i>Pressatia</i>
PSG-	<i>Promastigote secretory gel</i> (Gel secretor de promastigota)
<i>Py.</i>	<i>Psychodopygus</i>
qPCR-	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (
SINAN-	Sistema de Informações de Agravos e Notificação
spp.	Espécies
MGB	<i>minor groove binder</i>
UI	Microlitro
V.	<i>Viannia</i>
VS	Válvula do estomodeu

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MARCO TEORICO REFERENCIAL	18
2.1	Aspectos gerais das leishmanioses	18
2.2	Flebotomíneos	21
2.3	Leishmanias	23
2.4	Interação parasito-vetor	26
2.4.1	<i>Enzimas digestivas</i>	27
2.4.2	<i>Matriz peritrófica</i>	27
2.4.3	<i>Adesão ao epitélio intestinal (LPG)</i>	28
2.4.4	<i>Proteoglicanos (PSG)</i>	29
2.5	Especificidade versus permissividade	29
2.6	O papel de <i>Mg. migonei</i> e <i>Lu. longipalpis</i> no ciclo de transmissão das leishmanioses	31
3	JUSTIFICATIVA	34
4	PERGUNTA CONDUTORA	35
5	HIPOTESE	36
6	OBJETIVOS	37
6.1	Objetivo geral	38
6.2	Objetivos específicos	37
7	METODOLOGIA	38
7.1	Considerações éticas	38
7.2	Comparação <i>in vitro</i> do desenvolvimento das cepas utilizadas no estudo, <i>L. (V.) braziliensis</i> (XB29-GFP) e <i>L. (L.) infantum</i> (OGVL-mCherry)	38
7.3	Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>Mg. migonei</i> e <i>Lu. longipalpis</i>	39
7.3.1	<i>Colônia de Mg. migonei IAM/FIOCRUZ (Colônia A)</i>	39
7.3.1.1	Captura dos flebotomíneos	39
7.3.1.2	Manutenção das colônias de flebotomíneos	40
7.3.2	Manutenção da colônia de <i>Mg. migonei</i> e <i>Lu. longipalpis</i> – Charles University, Praga	41

7.4	Análise do desenvolvimento de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> em <i>Mg. migonei</i> e <i>Lu. longipalpis</i>, em infecções simples e coinfeção	41
7.4.1	<i>Infecção experimental</i>	41
7.4.2	<i>Desenvolvimento e localização de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum in situ</i></i>	41
7.4.3	<i>Análise morfométrica e classificação morfológica de <i>Leishmania spp.</i></i>.....	43
7.5	Análise estatística	44
8	RESULTADOS	45
8.1	Comparação in vitro do desenvolvimento de <i>L. (V.) braziliensis</i> (XB29-GFP) e <i>L. (L.) infantum</i> (OGVL-mCherry	45
8.2	Análise e comparação do desenvolvimento de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> em infecções simples e coinfeção em <i>Mg. migonei</i>	46
8.3	Análise e comparação do desenvolvimento de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> em infecções simples e coinfeção em <i>Lu. Longipalpis</i>	50
8.4	Análise morfométrica e classificação morfológica de <i>Leishmania spp.</i>	54
9	DISCUSSÃO	58
10	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	Apendice A -Artigo 1	76
	Apendice B - Artigo 2	84
	Apendice C - Artigo3	85
	Apendice D - Artigo 4	86
	Apendice E - Artigo 5	87
	Anexo A- Parecer do comitê de éticas do IAM/FIOCRUZ	88

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (MARZOCHI, 1992). Constituem um espectro de doenças presentes em regiões tropicais e subtropicais, distribuídas em 98 países de todos os continentes (ALVAR *et al.*, 2012; MAROLI *et al.*, 2013). A complexidade das leishmanioses é representada pelas diversas manifestações clínicas, pela diversidade de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, o que tornam esta endemia um desafio para parasitologistas e para o estabelecimento programas de controle eficientes para interromper a sua transmissão (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2011).

Devido a diferenças eco-epidemiológicas é importante a caracterização e o estudo da adaptação destes parasitos tanto em relação aos vetores quanto aos hospedeiros e reservatórios (LIMA, 2010). Os agentes etiológicos das leishmanioses são transmitidos através da picada de fêmeas hematófagas de pequenos dípteros, conhecidos como flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK, 1990). Estes insetos ao realizarem o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingerem juntamente com células sanguíneas o parasito *Leishmania*.

São conhecidas cerca de 1.000 espécies de flebotomíneos no mundo e estima-se que 81 delas sejam capazes de transmitir *Leishmania* spp. Nas Américas cerca de 530 espécies e subespécies de flebotomíneos foram descritas, destas, aproximadamente 20 são prováveis vetores de *Leishmania* que causam a doença no homem (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE- FILHO, 2015).

Em Pernambuco, 41 espécies já foram registrada (DE AGUIAR; VIEIRA, 2018), e em algumas regiões há predominância de *Migonemyia migonei* e *Pressatia choti*, espécies consideradas potenciais vectoras das leishmanioses (DANTAS-TORRES *et al.*, 2017). Várias espécies de flebotomíneos são descritas na transmissão das leishmanioses no Brasil, ressaltando-se como principais transmissoras da leishmaniose tegumentar (LT): *Nyssomyia intermedia*, *Ny. whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Psychodopygus wellcomei*, *Py complexus* e *Lutzomyia flaviscutellata* (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE-FILHO; 2015; DVORAK; SHAW; VOLF, 2018; RANGEL; LAINSON, 2003), além de registros de detecção de DNA de *Leishmania* em outras espécies, como *Ny. neivai* e *Lu. fischeri* (PITA-PEREIRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010). No Brasil, a principal espécie associada à

transmissão da leishmaniose visceral (LV) é *Lu. longipalpis* (CHAGAS, 1936; DEANE; DEANE, 1954). Contudo, o papel vetorial de *Mg. migonei* também tem sido discutido em áreas onde há registro de casos humanos e caninos da doença, onde a sua presença é confirmada, porém nessas áreas o vetor comprovado (*Lu. longipalpis*) não está presente elevando a hipótese de participação desta espécie no ciclo de transmissão das leishmanioses. Recentemente esta espécie foi considerada como vetor permissivo ao desenvolvimento de *Leishmaniaia (Leishmania) infantum* (CARVALHO *et al.*, 2007, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2003).

As características antropofílicas, a identificação da infecção natural e a distribuição espacial e sazonal em associação com o registro de casos humanos são alguns dos critérios utilizados para a comprovação de espécies como vetoras. Evidências epidemiológicas, acrescidas, ou não, da infecção natural pelos parasitos, a capacidade do inseto em permitir o desenvolvimento completo do parasito após a digestão do repasto sanguíneo, bem como de transmitir o parasito a um hospedeiro susceptível também são critérios utilizados para incriminar outras espécies como vetoras (KILLICK-KENDRICK, 1990; MAROLI *et al.*, 2013; READY, 2013). No entanto, há restritas informações sobre vários destes aspectos, particularmente nas Américas, de modo que algumas espécies de flebotomíneos têm sido consideradas como possíveis vetores da leishmaniose sem atender aos critérios que comprovem sua competência vetorial (CARVALHO *et al.*, 2010; MONTOYA-LERMA *et al.*, 2003; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; SALOMÓN *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 1998).

Existem indícios sobre a participação da espécie *Mg. migonei* na transmissão de *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (NIEVES; PIMENTA, 2000; PITA-PEREIRA *et al.*, 2005). Esta espécie de flebotomíneo é amplamente distribuída no Brasil, podendo ser encontrada nos domicílios e abrigos de animais, com capacidade de adaptação a ambientes modificados (AZEVEDO; RANGEL, 1991; FORATTINI, 1973; GOMES *et al.*, 1990; GOMES, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 2012; RANGEL *et al.*, 1986; RANGEL; LAINSON, 2009).

No Estado de Pernambuco, *Mg. migonei* é relatada principalmente em áreas rurais, inclusive no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte, onde a espécie predomina e há registro de detecção de DNA por *L. (L.) infantum*, parasito comprovadamente transmitido por *Lu. longipalpis* (CARVALHO *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2016). *Lu. longipalpis* é uma espécie permissiva ao desenvolvimento de várias espécies de leishmanias, e está presente em vários

estados do Brasil (SOUSA-PAULA *et al.*, 2020) e um estudo experimental em laboratório demonstrou o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) peruviana* (HLAVACOVA, VOTYPKA, VOLFF, 2013; PIRES, 2014,), em condições laboratoriais.

Alguns estudos relatam a presença de infecções mistas de *Leishmania* em cães (QUARESMA *et al.*, 2011), porém em flebotomíneos não há relatos na literatura a respeito do desenvolvimento concomitante de duas espécies de *Leishmania*. Sadlova et al. (2011) e Kravera et al. (2015) relataram estudos com coinfeções de cepas de *L. danovani* marcadas com fluorescência em flebotomíneos, demonstrando uma possibilidade de estudos para análise de coinfeção de espécies de *Leishmania*, podendo diferenciá-las através da fluorescência.

Neste sentido, o desenvolvimento de estudos a respeito da interação *Leishmania*-vetor nas populações de flebotomíneos é de grande importância e contribui para uma melhor compreensão do potencial de transmissão e sobre os fatores que influenciam a epidemiologia da doença em uma determinada área. Este estudo será focado na avaliação do desenvolvimento da coinfeção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, marcadas com fluorescência, em *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*. A avaliação do desenvolvimento simples dos dois parasitos nas duas espécies de flebotomíneos, também será feita e estas análises poderão auxiliar no entendimento da participação dessas espécies no ciclo de transmissão das leishmanioses e contribuir para melhorar as ações de controle dessas endemias.

2 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

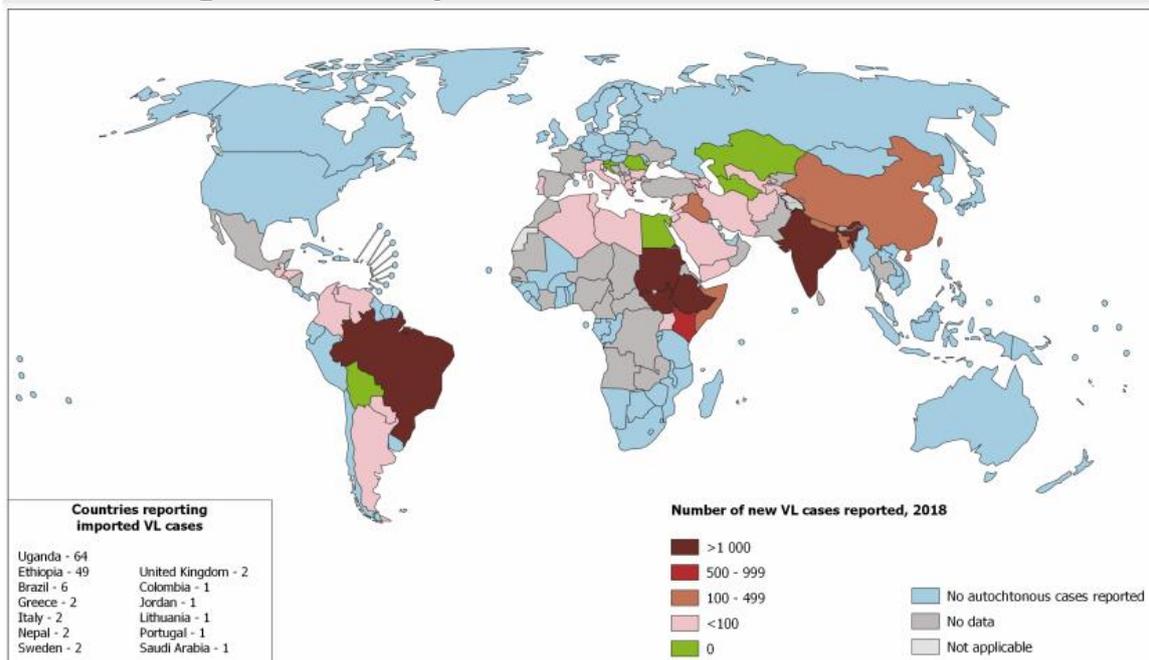
Nesta seção serão abordados alguns tópicos importantes para construção da tese.

2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses ocorrem em 98 países, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo países das Américas, África, Ásia, Oriente Médio e Europa, sendo considerada como uma das principais doenças tropicais negligenciadas (ALVAR *et al.*, 2012; MAROLI *et al.*, 2013). Nas Américas, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV), que é causada por *L. (L.) infantum* (LUKES *et al.*, 2007; MAURÍCIO *et al.*, 2000), e a leishmaniose tegumentar (LT), que é causada por várias espécies de *Leishmania* que apresentam um tropismo por tecidos cutâneos (BASANO; CAMARGO, 2004). No mundo cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018), sendo o Brasil um dos principais focos de LV e LT (Figura 1 e 2, respectivamente).

A LV pode causar alta morbidade pois, se não for tratada, pode ser fatal em mais de 95% dos casos. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos ocorrem a nível mundial a cada ano (Figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Em 2013, mais de 90% dos novos casos notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em sete países, entre eles Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (MAROLI *et al.*, 2013). No Brasil no ano de 2019 foram notificados e confirmados 2827 casos, a sua ocorrência está em constante expansão (BRASIL 2018, 2021). O maior número de casos se concentra na região Nordeste e em Pernambuco foram confirmados 183 casos (BRASIL, 2021). A sintomatologia clássica é febre recorrente, fadiga e perda de peso; a invasão das células sanguíneas e do sistema retículo-endotelial acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2006; REY, 2001).

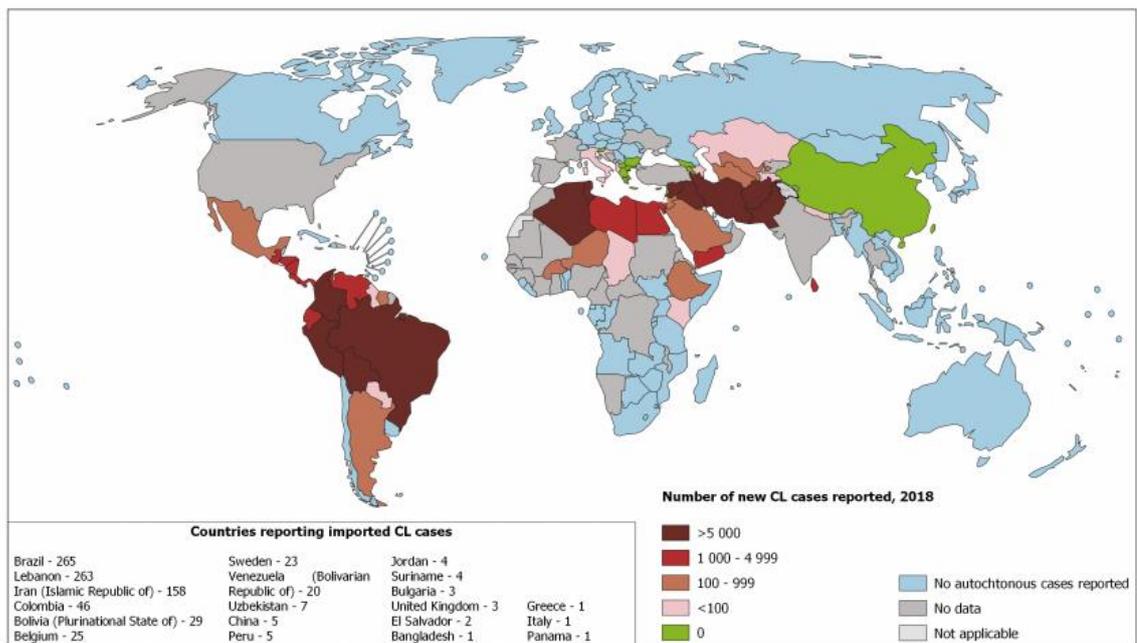
Figura 1- Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2018



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2021).

A LT é a forma mais comum de leishmaniose e estima-se que cerca de 600.000 mil a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente no mundo. No Brasil foram notificados e confirmados mais de 16 mil casos em 2019, e no mesmo ano em Pernambuco foram confirmados 329 casos (OMS 2018, SINAN, 2021).

Figura 2- Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar, 2018



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2021).

A forma cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum da doença, caracteriza o acometimento da pele após a inoculação do parasito pela picada do inseto transmissor. A lesão é geralmente ulcerada e pode se apresentar de forma única, múltipla ou disseminada (COSTA, 2011). Estima-se que de 2% a 5% dos casos de lesões cutâneas desenvolvam lesão mucosa (Figura 3), outra manifestação clínica da LT, sendo a forma grave da doença (ALMEIDA *et al.*, 1995; MARDSEN *et al.*, 1986; 1994). Cerca de 35.000 casos ocorreram a cada ano no Brasil (BRASIL, 2010), sendo este número sempre ascendente em todas as unidades federativas, embora a subnotificação represente um problema constante nas áreas de transmissão da enfermidade, de 2004 a 2013 foram registrados 219.441 casos de LT no país (MAIA- ELKHOURY *et al.*, 2007).

Figura 3- Lesão ulcerada- Manifestação clínica clássica da leishmaniose tegumentar



Fonte: A autora, 2011.

No Brasil, já foram verificadas sete espécies que causam doença no homem, sendo duas do subgênero *Leishmania* e cinco do subgênero *Viannia*, a saber: *L. (L.) infantum*, causadora da forma visceral e *L. (L.) amazonenses*; *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* causadoras da forma tegumentar (LAINSON; SHAW, 1998).

A grande variedade de agentes etiológicos e de várias espécies de flebotomíneos envolvidos no ciclo de transmissão, além das dificuldades no diagnóstico e tratamento da doença são fatores que dificultam o seu controle. Estes fatores associados à precariedade socioambiental, atingem a população rural, que é a principal população acometida, tornando assim as leishmanioses doenças

negligenciadas. (BRACHO *et al.*, 2007), sendo os indivíduos do sexo masculino na faixa etária jovens e adultos infectados em maior proporção por exposição ocupacional. Entretanto, a doença vem ganhando importância no contexto doméstico, afetando crescente número de mulheres e crianças (BRASIL, 2007; CIFUENTES; OSPINO; ARIAS, 2007).

2.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha ou “birigui”, são vetores naturais de alguns agentes etiológicos causadores de doença no homem e animais, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella*, de alguns vírus (MAROLI *et al.*, 2013). A primeira descrição de um flebotomíneo ocorreu na Itália, em 1786 por Scopoli, que descreveu a espécie *Bibio papatasi*, que anos depois teve sua nomenclatura alterada para *Phlebotomus papatasi* (DEDET *et al.*, 2003; MAROLI *et al.*, 2013).

Esses insetos são dípteros que pertencem a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. De acordo Young e Duncan (1994) estão agrupados em seis gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994). Na subfamília Phlebotominae, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os que apresentam importância médica, pela capacidade de transmitir *Leishmania* spp. e estarem amplamente distribuídos geograficamente (MAROLI *et al.*, 2013). Galati (1996, 2003), propõe uma chave de identificação reclassificando os flebotomíneos do Novo Mundo em 22 gêneros. Atualmente, são descritas quase 1.000 espécies de flebotomíneos, sendo 530 encontradas no novo mundo, distribuídas entre 23 gêneros, ocorrendo em 28 países. (SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017).

Os flebotomíneos adultos medem geralmente de 2 a 3 mm, apresentam corpo delgado, pernas longas e delgadas. São insetos holometábolos e as fêmeas precisam de sangue para produção de ovos. (KILLICK-KENDRICK, 1999). Após a postura de ovos, denominada oviposição, as fêmeas morrem (VOLF; VOLFOVA, 2011).

Os ovos possuem 0,3 a 0,5 mm de comprimento, possuem forma ovóide ou elipsóide, são inicialmente brancos ou cinzas, porém, escurecem dentro de algumas horas após a oviposição (VOLF; VOLFOVA, 2011). Fatores externos como temperatura, umidade, fotoperíodos podem desencadear diapausas, mas em geral as larvas eclodem em um período de 7 a 10 dias. A fase larvar que é formada por quatro estádios, dura por um período de aproximadamente três semanas. As larvas de primeiro estágio possuem um par de cerdas, enquanto o segundo ao quarto estádios possuem dois pares de cerdas (Figura 4). Quando estão à procura de alimento as larvas se locomovem através de movimentos ondulatórios e nos últimos dias antes de mudar de fase, interrompem a alimentação e procuram algum suporte sólido para servir de substrato para a fixação da pupa, um período que pode perdurar por 7 a 12 dias até a emergência do adulto (LAWYER; PERKINS, 2004). A pupa é esbranquiçada ou amarelada, escurecendo progressivamente à medida que se oxida em contato com o ar.

Figura 4-Formas imaturas dos flebotomíneos



Fonte: A Autora, 2019.

Legenda: A- Ovos e B- Larvas (L3/L4)

Nota: As formas evolutivas estão apontadas por setas em vermelho.

As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvem-se em locais úmidos ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Geralmente, os locais de criação das larvas são pouco conhecidos e de difícil acesso, no último estágio as larvas buscam locais mais secos para se transformarem em pupa (FORATTINI, 1973).

Estes insetos são adaptados a uma grande diversidade de ambientes, altitudes, temperaturas e umidades. Na América do Sul podem ser capturados desde o semiárido nordestino brasileiro, até as florestas amazônicas e as montanhas andinas (SHAW; LAINSON, 1987, 1999).

Os adultos (Figura 5) possuem hábitos crepusculares e noturnos, embora possuam também hábitos matutinos e vespertinos no interior das matas (FORATTINI, 1973). Apresentam dimorfismo sexual, e tanto as fêmeas quanto os machos se alimentam de fontes de açúcar para produzir energia. Ademais, as fêmeas precisam de uma dieta sanguínea para o desenvolvimento e produção dos ovos (BASTOS, 2014; FORATTINI, 1960; RANGEL; LAINSON, 2003). A postura ocorre alguns dias após o repasto sanguíneo e vários fatores podem estar envolvidos na oviposição, entre eles um complexo de interações ambientais, físicas e químicas (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Figura 5- Fêmea de *Pressatia choti*



Fonte: A autora, 2020.

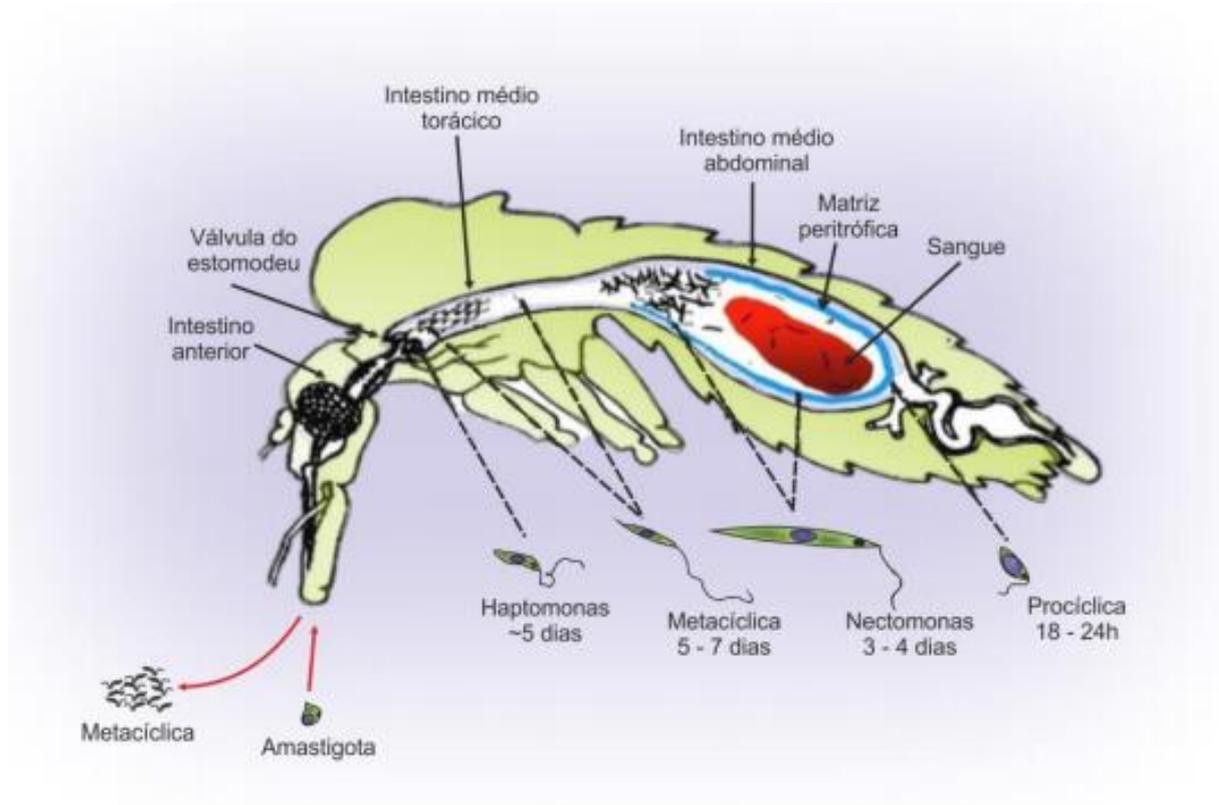
2.3 *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos, heteróxeos, que possuem único núcleo, podendo se apresentar de duas formas: amastigotas e promastigotas. As formas amastigotas são ovóides e não possuem flagelo livre aparente, com multiplicação no interior dos macrófagos, sendo esta forma

intracelular obrigatória nos hospedeiros vertebrados. As promastigotas, são flageladas, encontradas nos hospedeiros invertebrados, multiplicando-se por divisão binária dentro do trato alimentar do inseto vetor, a promastigota metacíclica é a forma infectante (SIMPSON, 1987).

As espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* são parasitos com desenvolvimento suprapilário (desenvolvimento restrito ao intestino médio), ao passo que as espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento peripilário (entram no intestino posterior, migram para a região do piloro e então seguem para o intestino anterior) (Figura 6) (BATES, 2007; KAMHAWI, 2006; LAINSON; SHAW, 1987).

Figura 6-Formas de desenvolvimento das leishmanias



Fonte: Pimenta, Freitas e Secundino (2012).

A infecção é iniciada quando o flebotomíneo ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas, o sangue segue para intestino médio ou posterior. Posteriormente, os parasitos de *Leishmania* diferenciam em vários estágios de desenvolvimento distintos à medida que migram do intestino para a

válvula do estomodeu. Esses estágios caracterizam-se pela morfologia e mudanças funcionais destinadas a garantir a sua sobrevivência no flebotômíneo.

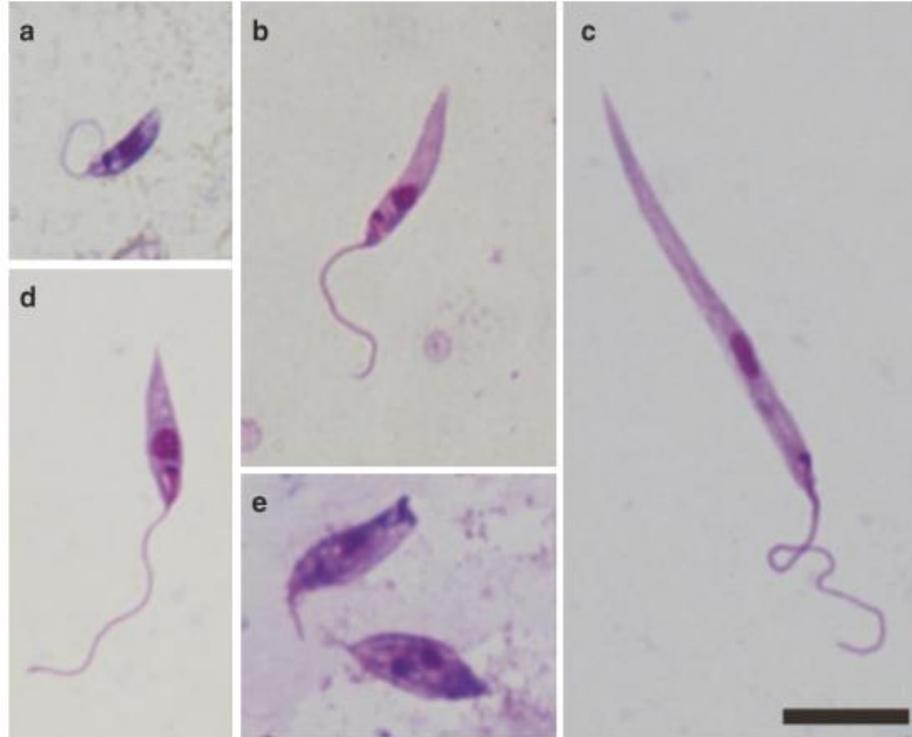
Primeiro, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas com flagelos curtos e começam o primeiro ciclo de multiplicação, em geral são relativamente resistentes ao ataque das enzimas digestivas. Estas formas de leishmanias são encontradas no intestino do inseto vetor e confinadas pela matriz peritrófica (MP), composta por proteínas, glicoproteínas e quitina (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; PIMENTA *et al.*, 1997; PRUZINOVA *et al.*, 2015). As promastigotas procíclicas (Figura 7a) se diferenciam em nectomonas longas (Figura 7c), cuja função é escapar do confinamento da matriz peritrófica, para ancorar no revestimento das células epiteliais no intestino médio e migrar em direção à parte anterior do intestino médio. Leptomona (nectomona curta) (Figura 7b) é a forma mais curta do parasito e surge de nectomonas longas e passa pelo segundo ciclo de multiplicação no flebotômíneo (BATES, 2004; ROGERS *et al.*, 2002). Estas formas produzem o PSG (*promastigote secretory gel*), que tem papel fundamental na transmissão, provocando um grande acúmulo de parasitos na válvula do estomodeu (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Finalmente, observam-se dois estágios na válvula do estomodeu, haptomonas e promastigotas metacíclicas (Figura 7d). As haptomonas (Figura 7e), cujas formas precursoras ainda estão em questão (nectomona ou leptomona) são parasitos com flagelos curtos que não são móveis e se fixam a válvula do estomodeu (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KAMHAWI, 2006).

A forma promastigota metacíclica (Figura 8d), o estágio infeccioso, são encontradas atrás da válvula do estomodeu e são altamente adaptadas para transmissão. O seu corpo celular é pequeno com um flagelo longo e com movimentos rápidos, é resistente a lise mediada pelo complemento. As alterações na válvula do estomodeu, causadas pela ligação dos flagelos das formas haptomonadas por meio de estruturas tipo hemidesmossomos promovem a sua degeneração através da secreção de quitinases, fazendo com que permaneça por mais tempo aberta (VOLF *et al.*, 2004). Deste modo, o flebotômíneo ao realizar o repasto sanguíneo, regurgita uma parte do conteúdo intestinal contendo os parasitos, infectando o hospedeiro vertebrado (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992).

A Figura 7 representa as principais formas de desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania* no intestino médio do inseto vetor, durante a infecção.

Figura 7- Principais formas de desenvolvimento de leishmanias



Fonte: DVORAK; SHAW; VOLF; 2018

Legenda: a) promastigota procíclica; (b) leptomona (= curta nectomona); (c) nectomona longa; (d) promastigota metacíclica; (e) duas haptomonas

A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente nas Américas, sendo no Brasil a única espécie que ocorre em todas as regiões (BRASIL, 2007). Em Pernambuco, há evidências que esta seja a única espécie envolvida na transmissão da LT com diversas variantes circulantes (BRITO *et al.*, 2009). Outra importante espécie de *Leishmania* é a *L. (L.) infantum* que está presente principalmente na América Latina, sendo o Brasil, um dos principais focos deste parasito (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2014). Esta espécie é a causadora da LV, que é a forma mais grave da doença em humanos e nos cães (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014).

2.4 Interação parasito-vetor

O estabelecimento da infecção do parasito no vetor envolve várias etapas. O desenvolvimento é iniciado quando as fêmeas dos flebotomíneos ingerem sangue

com macrófagos infectados com amastigotas. A partir daí o parasito tem que ultrapassar algumas barreiras para estabelecer a infecção, tais como, as enzimas digestivas no intestino que devido a mudanças de pH podem promover a morte dos parasitos, a matriz peritrófica que se comporta como uma barreira física permitindo o escape do parasito para fora do intestino médio, a excreção do sangue digerido, que pode resultar na eliminação dos parasitos do intestino médio, as reações do sistema imune, a anatomia e fisiologia do intestino anterior, que pode impedir a fixação de *Leishmania* no epitélio do intestino médio, representando também uma barreira física, a migração anterior e a regurgitação de promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo no tecido do hospedeiro (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KILLICK-KENDRICK, 1990; SACKS; KAMHAWI, 2001; VOLF *et al.*, 2014).

2.4.1 Enzimas digestivas

Uma das primeiras barreiras enfrentadas pelo parasito no vetor são as enzimas digestivas, estas representam uma das mais determinantes para a sobrevivência do parasito no intestino médio de flebotomíneos. As células epiteliais do intestino médio, logo após o repasto sanguíneo iniciam a produção de proteases, como tripsina e quimiotripsina, e apresentam seus níveis mais significativos no período de 18-48 horas, dependendo da espécie de flebotomíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001; PRUZINOVA *et al.*, 2015; RAMALHO-ORTIGÃO; SARAIVA; TRAUB-CSEKO, 2010). Alguns estudos têm revelado que a atividade destas proteases pode estar diretamente envolvida no desenvolvimento das leishmânias e estabelecimento da infecção, como por exemplo a *L. (L.) major* que retarda e diminui o pico de atividade da tripsina e aminopeptidases no intestino de *P. papatasi* (BOROVSKY; SCHLEIN, 1987; PIMENTA *et al.*, 1997).

2.4.2 Matriz peritrofica

Outra importante barreira é a matriz peritrófica (MP), que é um envoltório semi-permeável, que fisicamente separa o sangue ingerido do epitélio intestinal e compartimentaliza a digestão entre os espaços endo e ectoperitrófico. É uma estrutura composta por quitina, proteínas e glicoproteínas, e tem a importante função

de proteger o intestino médio da ação de agentes patogênicos, químicos e danos mecânicos, assim representando uma potencial barreira ao desenvolvimento das leishmanias (LEHANE, 1997; PIMENTA *et al.*, 1997).

Após a desintegração da MP, os parasitos presentes no sangue digerido precisam se ligar ao epitélio intestinal para evitar assim sua eliminação com o sangue através da excreção. Para isso é necessário a ligação dos parasitos nas microvilosidades do epitélio do intestino médio através de seus flagelos (BATES, 2008; KAMHAWI, 2006; MYSKOVA *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2010). Alguns autores afirmam ser esta etapa determinante na interação parasito-vetor e do estabelecimento da infecção, podendo atuar em alguns vetores protegendo da infecção e em outras interações parasito-vetor atuar ajudando no estabelecimento da infecção (PIMENTA *et al.*, 1994; SACKS, 2000). Walters *et al.*, (1993) observaram que há o aprisionamento de parasitos de *L. (V.) panamensis* na matriz peritrófica de *P. papatasi*, demonstrando ser uma importante barreira contra o estabelecimento da infecção. Porém, outros estudos demonstraram que a MP protege os parasitos da ação das enzimas digestivas, como em experimento realizado por Pimenta *et al.* (1997) quando fizeram um bloqueio na MP de *P. papatasi* em horas já haviam parasitos de *L. (L.) major* mortos.

2.4.3 Adesão ao epitélio intestinal (LPG)

A adesão das promastigotas ao epitélio do trato digestório do flebotomíneo é proporcionada pelo lipofosfoglicano (LPG) que é um glicolípido abundante que reveste toda a superfície, incluindo o flagelo de todas as fases promastigotas de *Leishmania* (PIMENTA *et al.*, 1994; SACKS *et al.*, 1984; SARAIVA *et al.*, 1995). A estrutura básica do LPG é altamente conservada em todas as espécies e o seu papel para permitir a adesão dos parasitos ao intestino médio dos flebotomíneos vem sendo investigado nos últimos anos (DOBSON *et al.*, 2010; MYSKOVA *et al.*, 2007; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Sacks, 2000 relatou um estudo onde modificou o LPG dos parasitos e o mesmo perdeu a capacidade em persistir no vetor e foi eliminado juntamente com o bolo fecal, demonstrando o papel fundamental no estabelecimento da infecção. O experimento foi realizado com *L. (L.) major* em *P. papatasi* e *P. dubosqui*, ambos vetores específicos.

Em um outro estudo explorando as bases moleculares da competência vetorial, Myskova et al. (2007) revelaram uma correlação notável entre a glicosilação das proteínas do LPG no intestino do vetor com a sua especificidade *versus* permissividade, neste estudo foi observado o estabelecimento e desenvolvimento de *Leishmanias* independentes de LPG. Para a autora a função do LPG está relacionada a interação parasito-vetor e somente é necessária em vetores específicos (MYSKOVA *et al.*,2007; SVAROVSKA *et al.*, 2010).

2.4.4 Proteofosfoglicanos (PSG)

Outro importante fator na interação parasito vetor é o PSG, estudos recentes têm investigado o papel do PSG, uma matriz gelatinosa, constituída principalmente por proteofosfoglicanos, molécula densa de alto peso molecular, produzida na fase final da infecção na transmissão de *Leishmania* (ROGERS *et al.*, 2004; ROGERS; BATES, 2007; ROGERS, 2012). O PSG age durante o repasto sanguíneo, exercendo uma pressão na válvula do estomodeu, fazendo com que esta válvula permaneça constantemente, (ROGERS, 2012; ROGERS; BATES, 2007) liberando a regurgitação do PSG, parasitos e saliva com o repasto sanguíneo. Adicionalmente, foi observado que o PSG atua como um potente fator de virulência capaz de recrutar neutrófilos e macrófagos para o local da picada, exacerbando a infecção (BATES; ROGERS, 2004; ROGERS *et al.*, 2004; ROGERS *et al.*, 2009; SACKS; KAMHAWI, 2001). Outros estudos demonstraram que o acúmulo do PSG na saliva altera o comportamento alimentar dos flebotomíneos, tornando maior o tempo do repasto sanguíneo, bem como o número de tentativas de picada, aumentando a possibilidade de transmissão do parasito (ROGERS *et al.*, 2002; ROGERS; BATES, 2007). Este evento coincide com o pico da metaciclogênese no vetor, que é essencial para o sucesso na transmissão (ROGERS *et al.*, 2002).

2.5 Especificidade *versus* permissividade

Os flebotomíneos têm sido classificados como permissivos ou específicos a partir de estudos experimentais, que avaliam a sua capacidade de suportar o desenvolvimento de uma determinada espécie de *Leishmania* ou de ampla variedade de parasitos (VOLF; MYSKOVA, 2007). Além dessa característica outros

fatores estão sendo associados a permissividade ou especificidade dos vetores como a presença do LPG. Recentemente foi observado o desenvolvimento de *Leishmania*, independente de LPG, em quatro vetores permissivos para *L. (L.) major*: *Phlebotomus. arabicus*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* e *Lu. longipalpis*. Para Myskova *et al.*, (2007) o LPG é necessário em vetores específicos, enquanto, em vetores permissivos, o parasito se liga através de um mecanismo independente de LPG.

Vetores específicos (restritivos), como *P. papatasi*, apresentam ou permitem o desenvolvimento de um único parasito ou duas espécies de parasitos (PIMENTA *et al.*, 1994; CHAJBULLINOVA *et al.*, 2012). Em contraste, os vetores permissivos suportam infecções experimentais por ampla gama de *Leishmanias*. Um exemplo importante de um vetor permissivo é *Lu. longipalpis*, que esteve envolvido no estabelecimento de *L. (L.) infantum* na América Latina (VOLF; MYSKOVA, 2007), além de permitir em laboratório o desenvolvimento de outras espécies de *Leishmania*, como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) peruviana* (PIRES, 2014, HLAVACOVA, VOTYPKA, VOLF, 2013).

Até agora, poucos estudos foram conduzidos para investigar o desenvolvimento simultâneo de diferentes espécies de *Leishmania* no mesmo flebotomíneo (CHAJBULLINOVA *et al.*, 2012; INBAR *et al.*, 2013). Estudo anterior com *Mg. migonei* e duas espécies de *Leishmania* foi feito usando apenas infecções únicas, demonstrando diferenças entre o desenvolvimento de espécies de leishmânias dos subgêneros *Viannia* (peripilária) e *Leishmania* (suprapilária). *L. (L.) amazonensis* apresentou um desenvolvimento mais rápido que *L. (V.) braziliensis* (NIEVES; PIMENTA, 2000), demonstrando que *Mg. migonei* é um provável vetor permissivo. Até o momento, nenhum estudo comparou o desenvolvimento simultâneo de uma espécie do subgênero *Leishmania* com outra do subgênero *Viannia* no mesmo flebotomíneo.

2.6 O papel de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* no ciclo de transmissão das leishmanioses

Diversas espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão dos agentes causadores das leishmanioses, porém, o papel vetorial de algumas espécies em áreas endêmicas também tem sido discutido, principalmente onde a

presença do vetor primário não é confirmada ou menos abundante que outras espécies ditas não vetoras (CARVALHO *et al.*, 2007, 2010; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; READY, 2010; SALOMÓN *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2003).

É preciso entender alguns critérios para incriminação de uma espécie como vetor de um parasito. A incriminação de vetores descritos por Killick-Kendrick (1990) são baseados em características antropofílicas, na identificação da infecção natural e na distribuição geográfica do vetor em associação com registros de caso da doença, a capacidade do inseto resistir ao desenvolvimento completo do parasito, além da capacidade de transmitir o parasito a um hospedeiro susceptível.

Maroli (2013) descreve a incriminação de uma espécie como vetor baseado nos critérios descritos, e amplamente aceitos, por Killick-Kendrick, 1990, além de considerar que o vetor deve ser antropofágico e deve se alimentar do reservatório hospedeiro; além de considerar que o vetor deve estar infectado na natureza com a mesma espécie de *Leishmania* que ocorre em humanos, e isso deve ser verificado por comparação de isolados usando isoenzimas ou DNA.

Ready (2013) em sua revisão incorpora aos critérios amplamente utilizados de Killick-Kendrick (1990) alguns pontos criados por outros autores, além de introduzir dois novos critérios para incriminar uma espécie como vetor. Os dois novos critérios incluídos por Ready (2013) são isolamento de formas promastigotas e detecção de infecção natural em flebotomíneos silvestres, em mais de uma ocasião, além da observação do desenvolvimento do parasito no vetor, verificando a presença do parasito no intestino médio e na válvula do estomodeu. É também utilizado como critério uma forte associação ecológica, incluindo sazonalidade, em conjunto com o registro de casos humanos. Além disso, leva em consideração a atratividade do vetor em relação ao hospedeiro susceptível, através de picadas e análise da transmissão experimental em hospedeiro susceptível. A modelagem matemática também se aplica para análises referentes a importância do vetor para manutenção da transmissão da doença (READY, 2013).

No mundo, diversas espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão das leishmanioses, porém alguns são incriminados apenas por alguns indícios necessitando a realização de um estudo completo para comprovação da competência vetorial. No velho mundo as espécies comprovadamente vetoras de *L. (L.) infantum*, parasito causador da LV são: *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. argentipes*, *P. ariasi* e *P. neglectus* (READY, 2010). No Novo Mundo, *Lu. longipalpis*

é o vetor de *L. (L.) infantum* (LAINSON *et al.*, 1977), porém algumas outras espécies tem sido estudadas como potenciais vectoras, principalmente onde a presença do vetor primário não é confirmada (CARVALHO *et al.*, 2007, 2010; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; SALOMÓN *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2003).

Lu. longipalpis é uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica e está presente em regiões onde apresentam focos das leishmanioses. Seu hábito alimentar é eclético e antropofílico (LAINSON; RANGEL 2003, 2005) e possui habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos (RANGEL; VILELA, 2008). Em Pernambuco esta espécie é encontrada em vários focos de LV (CARVALHO *et al.*, 2010) e, eventualmente, em regiões onde ambas as formas de leishmanioses ocorrem, e a presença das espécies de *Leishmania* ocorrem de forma simpátrica, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010).

Em relação a *L. (V.) braziliensis* são diversas as espécies responsáveis por sua transmissão, tais como: *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis* e *Lu. wellcomei* (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE-FILHO; 2015; DVORAK; SHAW; VOLF, 2018; RANGEL; LAINSON, 2003), além de registros de detecção de DNA em outras espécies, como *Lu. neivai* e *Lu. fischeri* (PITA-PEREIRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010).

Estudos realizados em Pernambuco apresentaram evidências epidemiológicas da participação de *Mg. migonei* como vetor de *L. (L.) infantum* (CARVALHO *et al.*, 2010) e um estudo mais recente comprovou a susceptibilidade desse flebotomíneo ao desenvolvimento desse parasito (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Em relação a *L. (V.) braziliensis*, alguns estudos demonstraram o desenvolvimento do parasito no vetor (CARVALHO *et al.*, 2007, 2010; NIEVES; PIMENTA, 2000; SOUZA *et al.*, 2003). *Mg. migonei* é amplamente distribuída no Brasil, incluindo Rio de Janeiro, São Paulo e Ceará, onde pode ser encontrada nos domicílios e abrigos de animais, com capacidade de adaptação a ambientes modificados (AZEVEDO; RANGEL, 1991; FORATTINI 1973; GOMES *et al.*, 1990; GOMES, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 2012; RANGEL *et al.*, 1986; RANGEL; LAINSON, 2009). No Estado de Pernambuco, *Mg. migonei* é relatada principalmente em áreas rurais, inclusive no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte, onde a espécie predomina e há registro de infecção natural por *L. (L.) infantum* (CARVALHO *et al.*, 2010).

Em São Vicente Ferrer existem focos tanto de LT quanto de LV, porém a espécie *Lu. longipalpis* não é encontrada (CARVALHO *et al.*, 2010). Outra área rural onde ocorrem tanto a LT quanto a LV é Pesqueira, nesta localidade foram encontrados tanto *Mg. migonei* quanto *Lu. longipalpis* (SALES *et al.*, 2019), sugerindo a participação das duas espécies no ciclo de transmissão das leishmanioses.

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são zoonoses que apresentam uma incidência relevante em todas as regiões do Brasil. A ocorrência de formas clínicas graves, a ampla diversidade de vetores, a complexidade de espécies do parasito envolvidos e o aumento de casos registrados no estado de Pernambuco e na região Nordeste do país, justificam o desenvolvimento de estudos sobre a compreensão do processo de interação entre o parasito e o vetor envolvido na transmissão da doença. A identificação de uma espécie vetora envolvida no ciclo de transmissão de uma parasito nas regiões endêmicas, é de extrema importância para a definição das estratégias de controle.

É sabido da cocirculação de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, em algumas regiões como na cidade de Pesqueira, além de regiões onde as leishmanioses ocorrem de forma concomitantes, como em São Vicente Ferrer, além dos indícios de infecção natural e alguns experimentos laboratoriais sugerirem que essas duas espécies de flebotomíneos atuem na transmissão das *Leishmanias*, podendo ocorrer de forma concomitante. Logo são necessários mais estudos que demonstrem o desenvolvimento do parasito em populações dessas espécies de flebotomíneos. Além disso, a análise e comparação do desenvolvimento de duas espécies de *Leishmania* em duas espécies de flebotomíneos, *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, poderão auxiliar no melhor entendimento da participação desses flebotomíneos no ciclo de transmissão da doença. Neste sentido, o nosso estudo visa demonstrar, de forma inédita na literatura, a coinfeção de duas espécies de leishmanias em flebotomíneos e é de fundamental importância para avaliar o risco de surgimento de novos focos de leishmanioses e para o desenvolvimento de estratégias mais específicas e eficazes de controle da doença.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a susceptibilidade de espécimes de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* ao desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* a coinfecções em cada espécie e em infecções simples?

5 HIPÓTESE

Mg. migonei e *Lu. longipalpis* são susceptíveis ao desenvolvimento de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, tanto em coinfeções quanto em infecções simples.

6 OBJETIVOS

A seguir são descritos o objetivo geral e os específicos do presente trabalho.

6.1 Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, em coinfeccções e infecções simples.

6.2 Objetivos específicos

- a) Comparar in vitro o desenvolvimento das cepas utilizadas no estudo, *L. (V.) braziliensis* (XB29-GFP) e *L. (L.) infantum* (OGVL-mCherry);
- b) Estabelecimento e manutenção da colônia de *Mg. migonei* e manutenção da colônia de *Lu. longipalpis*;
- c) Analisar e comparar o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei*, em coinfeccção e infecções simples;
- d) Analisar e comparar o desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em *Lu. longipalpis*, em coinfeccção e infecções simples.

7 METODOLOGIA

Nesta seção são descritos os processos metodológicos realizados no presente estudo.

7.1 Considerações éticas

Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Charles University em Praga (registro: CZ 03069) e do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ nº 92/2015).

7.2 Comparação *in vitro* do desenvolvimento das cepas utilizadas no estudo, *L. (V.) braziliensis* (XB29-GFP) e *L. (L.) infantum* (OGVL-mCherry)

As cepas utilizadas no estudo foram: *L. (V.) braziliensis*-XB29 marcadas com GFP e *L. (L.) infantum*-OGVL marcadas com mCherry. Estas cepas foram construídas através de construções descritas por Sadlova *et al.*, (2010) e Kraeva *et al.*, (2015), pela integração estável da fluorescência (GFP em *L. (V.) braziliensis* e mCherry em *L. (L.) infantum*) no RNA mensageiro. As cepas dos parasitos usados no estudo possuíam em média 10 passagens *in vitro* e foram mantidas a 23°C em Meio 199 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1% de vitaminas BME (Sigma-Aldrich), 2% de urina humana (origem) e 250 µg/ml de amicina (Bristol-Myers Squibb, EUA). Os antibióticos selecionados foram 100 µg/ml de neomicina para *L. (L.) infantum* e 150 µl/ml de geneticina para *L. (V.) braziliensis*, de acordo com Sadlova *et al.*, (2013). Após o crescimento, os parasitos foram centrifugados a 2800g por 5 minutos a 23°C. O meio de cultura foi desprezado e o sedimento lavado e ressuspenso em 990 µl de solução salina estéril. Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 10 µl que foi diluída em 990 µl de solução salina com de formaldeído a 1% Posteriormente, 10 µl desta diluição foi aplicada em cada lado da câmara de Neubauer e as promastigotas foram contadas para determinar a concentração a ser utilizada nos experimentos de infecção que foi de 5×10^6 parasitos/mL. Para o estudo das curvas de crescimento *in vitro*, foram utilizadas duas doses iniciais: 10^4 promastigotas/ml e 10^5 promastigotas/ml. A concentração de parasitos foi analisada diariamente durante 7

dias (dia 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6), usando a contagem na câmara de Neubauer. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

7.3 Estabelecimento e manutenção da colônia de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*

Foi estabelecida uma colônia de *Mg. migonei* (Colônia A) no IAM/FIOCRUZ, Recife, Brasil e realizada a manutenção das colônias de *Mg. migonei* (Colônia B) e *Lu. longipalpis* (Colônia C) no departamento de parasitologia da Charles University em Praga, República Tcheca.

7.3.1 Colônia de *Mg. migonei* IAM/FIOCRUZ (Colônia A)

Descrição da colonização de *Mg. migonei* IAM/FIOCRUZ, realizada a partir de espécimens (ou indivíduos) capturados no município de Machados, Pernambuco.

7.3.1.1 Captura de flebotomíneos

As capturas foram realizadas no município de Machados (07°40'56" S 35°31'22" O), localizado em Pernambuco, a 218 km de distância de Recife. As coletas foram realizadas utilizando 10 armadilhas luminosas do tipo CDC (Centers for Disease Control and Prevention), posicionadas por um período de 12h em abrigos de animais (estábulo, galinheiros e chiqueiros) localizados no peridomicílio. Os espécimes capturados foram transferidos com o auxílio de capturadores para gaiolas (20 x 20 cm) revestidas com tecido "voil", envolvidas por um saco plástico contendo um chumaço de algodão umedecido com água para manutenção da umidade necessária a sobrevivência dos insetos. As gaiolas foram acondicionadas em caixas de isopor, nas quais também havia chumaços úmidos de algodão e foram, em seguida, transportadas para o IAM.

Após a morte, as fêmeas (cabeça e dois últimos segmentos abdominais) foram montadas entre lâmina e lamínula em solução Berlese (LANGERON 1949) e identificadas de acordo com a classificação proposta por Young e Duncan (1994). Os ovos pertencentes as fêmeas de *Mg. migonei* foram transferidos com o auxílio de um pincel fino para papel de filtro, acondicionadas em recipientes plásticos contendo gesso.

7.3.1.2 Manutenção das colônias de flebotomíneos

O estabelecimento e manutenção da colônia de *Mg. migonei* (Colônia A) foram realizados de acordo com Volf e Volfova (2011). Os flebotomíneos estão sendo mantidos em gaiolas de criação (40 x 40 cm) (Figura 9b) envoltas por um saco plástico transparente contendo algodão embebido em água, onde receberam solução de sacarose a 50% e uma vez por semana é realizada a alimentação sanguínea em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Após eclosão, as larvas são alimentadas com uma mistura de fezes e ração para coelho na proporção de 1:1 e mantidos em caixas plásticas contendo areia autoclavada e umedecida para manutenção da umidade (Figura 8a). Os insetos adultos foram expostos a fotoperíodo (14h de luz e 10h de escuro), mantidos a uma temperatura de 26°C e 70% de umidade. Os recipientes de criação são inspecionados diariamente para avaliação do ciclo de vida.

Figura 8- Potes e gaiola utilizados na colônia de flebotomíneos



Fonte: A autora, 2018.

7.3.2 Manutenção da colônia de *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* – Charles University, Praga

Além do estabelecimento e manutenção da colônia de *Mg. migonei* no Instituto Aggeu Magalhães (Colônia A), foi realizada manutenção de duas colônias (*Mg. migonei*- Colônia B e *Lu. longipalpis*- Colônia C) estabelecidas no insetário da Faculdade de Ciências da Charles University. Essas colônias foram estabelecidas a partir de fêmeas de *Mg. migonei* (Colônia B) coletadas em Baturité, Ceará, Brasil e de fêmeas *Lu. longipalpis* (Colônia C) coletadas em Jacobina, Brasil. Os espécimes foram mantidos sob condições descritas por Volf e Volfova, 2011, descritas acima.

7.4 Análise do desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, em infecções simples e coinfeção

As análises foram realizadas através da infecção experimental dos flebotomíneos com as cepas de *L. (V.) braziliensis*- XB29 marcadas com GFP e *L. (L.) infantum*-OGVL marcadas com mCherry, seguidas de análise microscópica de fluorescência com o protocolo descrito abaixo.

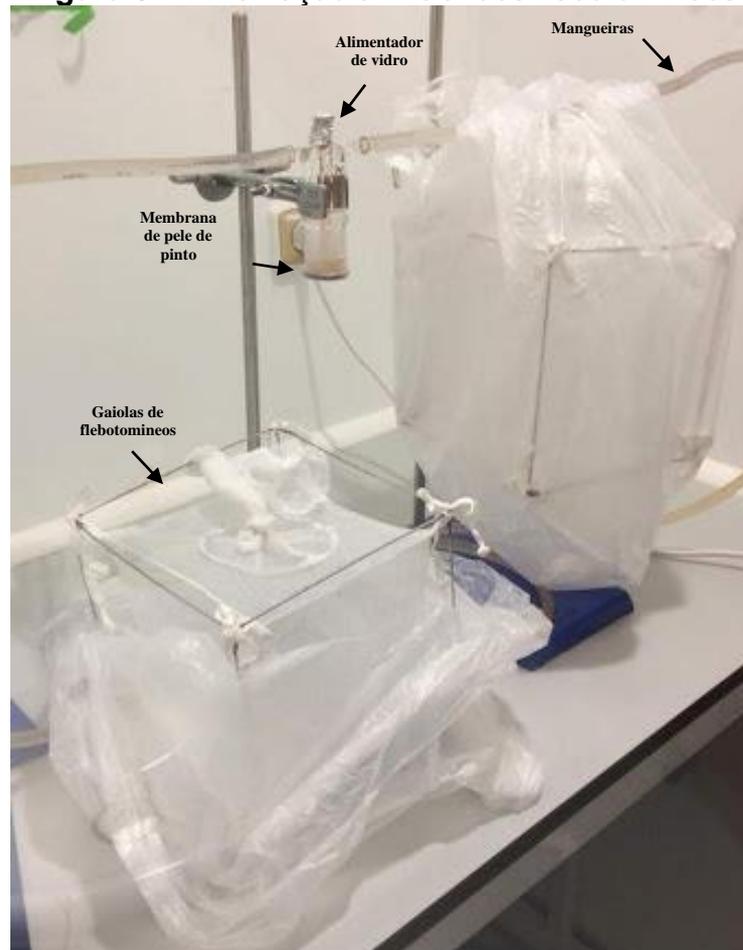
7.4.1 Infecção experimental

A infecção experimental de flebotomíneos com os parasitos foi realizada através de alimentadores artificiais de vidro envoltos com membrana de pele de pinto, provenientes de animais do biotério da Charles University. As membranas foram retiradas com auxílio de pinças e tesouras em fluxo e armazenadas em freezer a – 20 °C. Em seguida foi colocado no alimentador artificial uma amostra de 2,7 ml de sangue de coelho desfibrinado (Bioveta, República Tcheca). O sangue foi inicialmente aquecido em banho-maria a 56° C por 35 minutos para inativação do sistema complemento através do calor, juntamente com 300 uL de solução fisiológica contendo cerca de 5×10^6 promastigotas/ml (VOLF; VOLFOVA 2011). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Todo este sistema era interligado através de mangueiras que estavam conectadas ao banho Maria, que mantinha o sangue dentro dos alimentadores aquecido a temperatura de 34 °C (Figura 9).

Foram utilizados três grupos de 200 fêmeas com de 3-6 dias de idade para cada experimento. Os experimentos foram repetidos quatro vezes para cada espécie de flebotomíneo. A fonte de açúcar foi retirada 24 horas antes da realização do

experimento. As fêmeas foram alimentadas com amostra de sangue por cerca de 2 horas em sala escura, com umidade de 70% e temperatura de 26°C. O primeiro grupo foi alimentado com sangue infectado apenas com *L. (V.) braziliensis*, o segundo grupo com sangue infectado apenas com *L. (L.) infantum* e o terceiro grupo alimentado com sangue infectado com as duas espécies de *Leishmania* [*L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*]

Figura 9- Alimentação artificial dos flebotomíneos



Fonte: A autora, 2018.

7.4.2 Desenvolvimento e localização de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* *in situ*

Para analisar o desenvolvimento de *Leishmania* spp. no vetor foram feitas análises no 2° dia pós infecção (PI), dia em que os parasitos já estão no intestino do vetor e preso na matriz peritrófica, no 5° PI, onde as formas de promastigotas começam a se diferenciar e migrar para o intestino médio torácico (IMT) e intestino posterior (IP), e 8° dias PI onde as promastigotas infectantes estão presentes na

válvula de estomodeu (VS). Em cada ponto experimental, as fêmeas foram transferidas para uma placa de Petri sobre gelo para imobilização dos insetos, posteriormente foram colocadas em uma lâmina e dissecadas em uma gota de solução salina estéril removendo a cabeça, pernas e asas com estilete com ângulo de 90°. Em seguida, o intestino foi removido do corpo do flebotômíneo puxando delicadamente os dois últimos segmentos abdominais. Os intestinos médios individuais foram colocados em uma gota de solução salina, os parasitos foram visualizados em microscópio de fluorescência e seu número registrado.

O intestino dissecado foi analisado sob microscopia fluorescência para avaliar intensidade da infecção e a localização do parasito no intestino posterior, intestino médio abdominal, intestino médio torácico, região da cárdia e válvula do estomodeu. Os níveis de infecções foram classificados em categorias de acordo com a Myskova, Votypka e Volf (2008) como: infecção leve (<100 parasitos por intestino), infecção moderada (entre 100 e 1000 parasitos por intestino) e alta infecção (>1000 parasitos por intestino).

7.4.3 Análise morfométrica e classificação morfológica de *Leishmania* spp.

Esfregaços de intestino médio de *Lu. migonei* e *Lu. longipalpis* infectadas com *L. (V). braziliensis* e *L. (L.) infantum* do 5º e 8º dia PI, foram feitos após avaliação da intensidade e localização da infecção, para análises morfométricas e morfológicas. Para tal os esfregaços foram fixados com metanol, corados com Giemsa, e examinados em microscópio óptico com objetiva de 100x e fotografados com uma câmera D70 Olympus. É importante destacar que análise morfométrica foi realizada apenas nos grupos de infecção simples. Foram analisados 200 intestinos de cada interação parasito- vetor, totalizando 800 amostras.

O comprimento do corpo do parasito, além do comprimento e largura do corpo flagelar, de 200 promastigotas selecionadas aleatoriamente de fêmeas de cada espécie foram mensurados usando o software Imagem-J, sendo as formas promastigotas morfológicamente classificadas de acordo com Walters et al. (1989) e Sadlova et al. (2010). Para *L. (L.) infantum* as formas de desenvolvimento foram identificadas como descrito na Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação morfológica de leishmanias

<i>L. (L.) infantum</i>		
	Comprimento do corpo	Comprimento flagelar
Nectomonas longas	Comprimento do corpo $\geq 14 \mu\text{m}$	-
Nectomonas curtas	Comprimento do corpo $< 14 \mu\text{m}$	Comprimento flagelar < 2 vezes o comprimento do corpo
Promastigotas metacíclicas	Comprimento do corpo $< 14 \mu\text{m}$	Comprimento flagelar ≥ 2 vezes o comprimento do corpo
Haptomonas	-	Flagelo 0-3 μm
<i>L. (V.) braziliensis</i>		
	Comprimento do corpo	Comprimento flagelar
Nectomonas longas	Comprimento do corpo $\geq 13 \mu\text{m}$	-
Nectomonas curtas	Comprimento do corpo $< 13 \mu\text{m}$	Comprimento flagelar < 2 vezes o comprimento do corpo
Promastigotas metacíclicas	Comprimento do corpo $< 13 \mu\text{m}$	Comprimento flagelar ≥ 2 vezes o comprimento do corpo
Haptomonas	-	Comprimento flagelar \leq comprimento do corpo

Fonte: A autora, 2021

7.5 Análise estatística

As diferenças na intensidade de infecções (leve, moderada, alta), localização do parasito (intestino posterior, intestino médio abdominal, intestino médio torácico, região da cárdia, válvula do estomodeu), bem como a medidas dos parasitos foram avaliados por meio de testes qui-quadrado (χ^2), através de PRISM 5.0 Windows® Software (U.S.A).

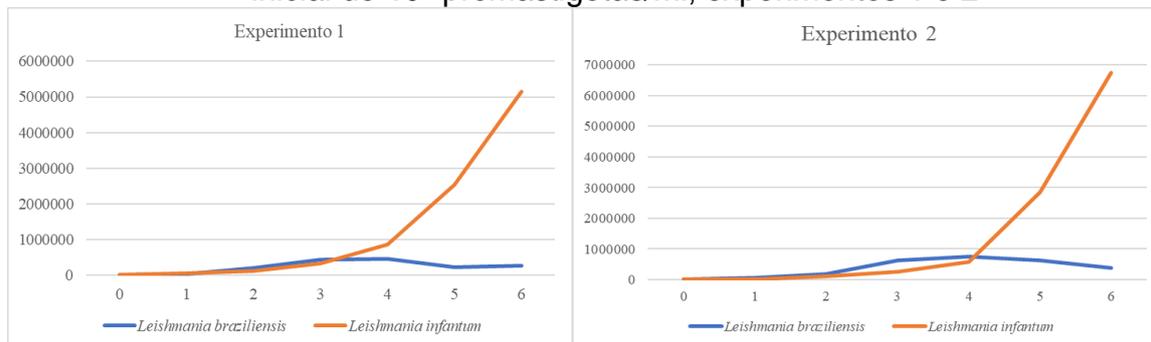
8 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados do presente estudo.

8.1 Comparação *in vitro* do desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* (XB29-GFP) e *L. (L.) infantum* (OGVL-mCherry)

É possível observar que na dose de inóculo inicial de 10^4 parasitos/ml a cepa de *L. (V.) braziliensis* cresce apenas até o terceiro dia, depois decresce e então estabiliza o crescimento, já a cepa de *L. (L.) infantum* cresce exponencialmente todo período observado (Gráfico 1 e 2). É possível observar uma diferença estatística entre os experimentos 1 e 2 ao compararmos os parasitos, onde *L. (L.) infantum* cresce mais rápido que *L. (V.) braziliensis* (Gráfico 1).

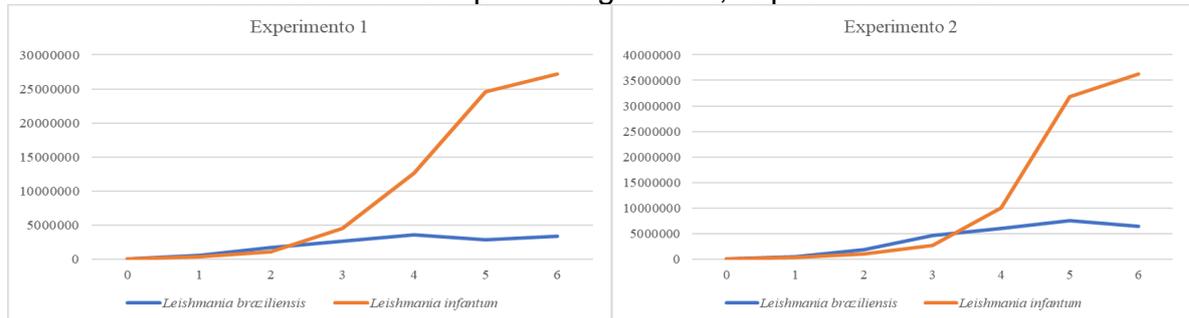
Gráfico 1- Curva de crescimento de *Leishmania* spp. *in vitro* a partir de um inóculo inicial de 10^4 promastigotas/ml, experimentos 1 e 2



Fonte: A autora, 2021

Ao analisarmos a curva de crescimento com o inóculo inicial de 10^5 parasitos/ml é possível observar o mesmo padrão da dose de 10^4 , onde *L. (V.) braziliensis* cresce até o terceiro dia e em seguida decresce e mantém, e *L. (L.) infantum* cresce exponencialmente (Gráfico 2).

Gráfico 2 -. Curva de crescimento de *Leishmania* spp. *in vitro* a partir de inóculo dose inicial de 10^5 promastigotas/ml, experimento 1 e 2



Fonte: A autora, 2021

O crescimento dos parasitos em cultura demonstraram um crescimento lento de *L. (V.) braziliensis* e rápido e exponencial de *L. (L.) infantum*. Não houve diferenças estatísticas entre os experimentos 1 e 2 de cada dose (dose inicial de 10^4 : $X^2 = 2.46$, $df = 3$, $P = 0.48$, a dose inicial de 10^5 : $X^2 = 6.77$, $df = 3$, $P = 0.08$) até o terceiro dia. A partir do dia 4 PI, *L. (V.) braziliensis* mostrou uma drástica mudança das curvas de desenvolvimento e o crescimento lento em comparação com *L. (L.) infantum*. As diferenças foram estatisticamente significativas (a dose inicial 10^4 : $X^2 = 256.2$, $df = 6$, $P < 0,01$, a dose inicial 10^5 : $X^2 = 95.1$, $df = 6$, $P < 0.01$) (Gráfico 1 e 2 respectivamente).

8.2 Análise e comparação do desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em infecções simples e coinfeção em *Mg. migonei*

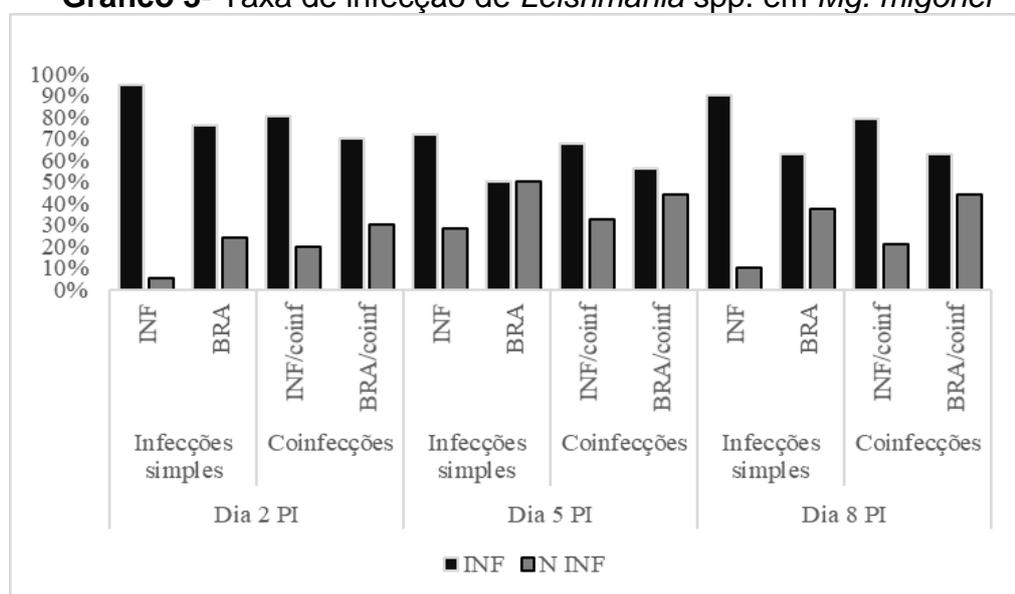
As infecções experimentais em *Mg. migonei* foram realizadas em quatro experimentos (alimentações artificiais). A taxa de hematofagia foi de 75% a 100% e a taxa de mortalidade foi de 64%, 61% e 53% (infecções por *L. (L.) infantum*, coinfeções e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente).

No dia 2 PI, ao analisarmos as coinfeções foi possível observar que *L. (L.) infantum* obteve uma taxa de infecção de 80% (Gráfico 3) e uma alta intensidade de infecção (Gráfico 4), enquanto que *L. (V.) braziliensis* obteve taxa de infecção de 70% (Gráfico 3) e moderada intensidade na infecção (Gráfico 4). Não houveram diferenças estatísticas na taxa de infecção ($X^2 = 0.53$, $df = 1$, $P = 0.47$) e já na intensidade da infecção foi diferente significativamente ao compararmos os parasitas ($X^2 = 16.18$, $df = 2$, $P = 0.0005$).

Nas infecções simples a taxa da infecção por *L. (L.) infantum* foi de 95% (Gráfico 3) e os parasitos cresceram vigorosamente, enquanto a taxa da infecção por *L. (V.) braziliensis* foi de 73% (Gráfico 3) e os parasitos cresceram mais lentamente. Ambas as espécies de parasitos estavam restritas ao espaço endoperitrófico (circundada por matriz peritrófica) tanto nas infecções simples quanto nas coinfeções (Gráfico 5).

Ao compararmos as taxas de coinfeções e infecções simples não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($\chi^2 = 4.29$, $df = 3$, $P = 0.23$).

Gráfico 3- Taxa de infecção de *Leishmania* spp. em *Mg. migonei*



Fonte: A autora, 2021

No dia 5 PI, nas coinfeções foi possível observar um desenvolvimento rápido de *L. (L.) infantum* que atingiu 68% na taxa de infecção e intensidade alta (Gráfico 4), enquanto em *L. (V.) braziliensis* essa taxa não passou de 56% (Gráfico 3) e intensidade moderada de infecção e houve diferença estatística ($\chi^2 = 11.77$, $df = 2$, $P = 0.0028$). (Gráfico 4). Não houve diferença estatística entre os grupos ($\chi^2 = 0.99$, $df = 2$, $P = 0.32$). Ao observarmos a localização dos parasitos foi possível ver que a maioria estava colonizando o IMT, e *L. (L.) infantum* colonizou a VS em mais fêmeas que *L. (V.) braziliensis*.

O mesmo foi observado nas infecções simples onde *L. (L.) infantum* possuía uma taxa de infecção de 72% (Gráfico 3) e alta intensidade de infecção (Gráfico 4), os parasitos colonizaram ambas as partes do intestino médio (intestino médio

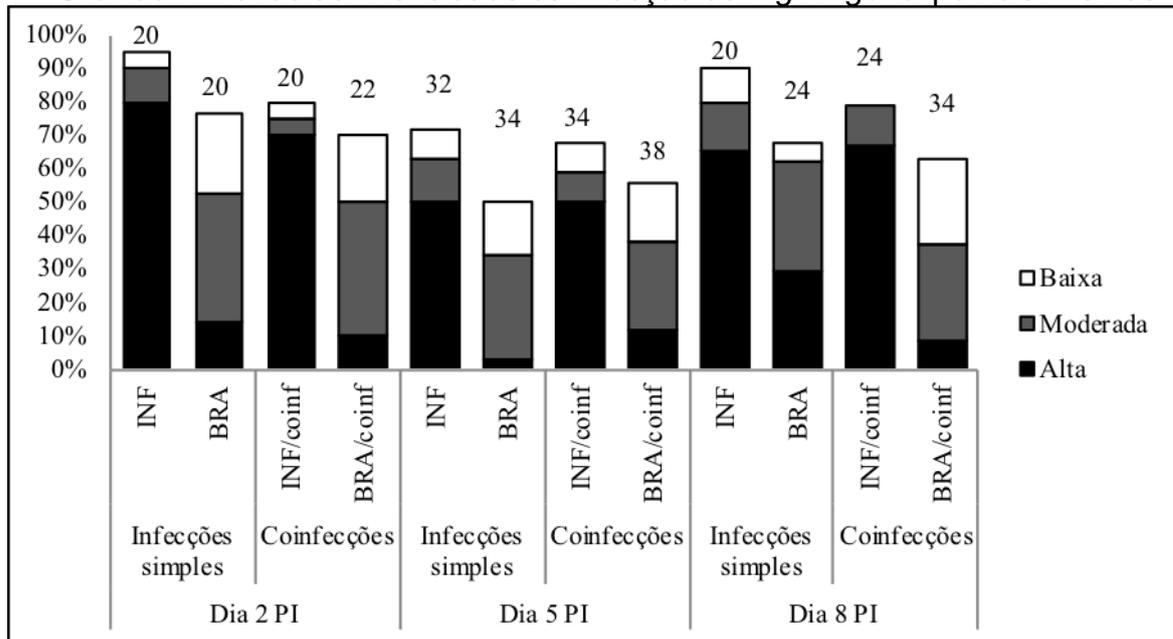
abdominal e torácico) (Gráfico 5) e mais de 20% das fêmeas de flebotomíneos também estavam com a válvula do estomodeu colonizada (Gráfico 5) (Figura 10).

Figura 10-Intestino médio torácico com a região da cárdia e válvula do estomodeu de *Mg. migonei*, infectados com *L. (L.) infantum*, no 5º diapós infecção



Fonte: A autora, 2018

Por outro lado, a taxa de infecção em *L. (V.) braziliensis* foi menor (50%) (Gráfico 3) e os parasitos colonizaram apenas o intestino médio e o intestino posterior (Gráfico 4). As diferenças nas taxas de infecção não foram significativas ($X^2 = 4.52$, $df = 3$, $P = 0.21$), enquanto as diferenças na localização dos parasitos foram significativas ($X^2 = 0.94$, $df = 1$, $P < 0,01$).

Gráfico 4- Taxas de intensidade da infecção de *Mg. migonei* por leishmanias

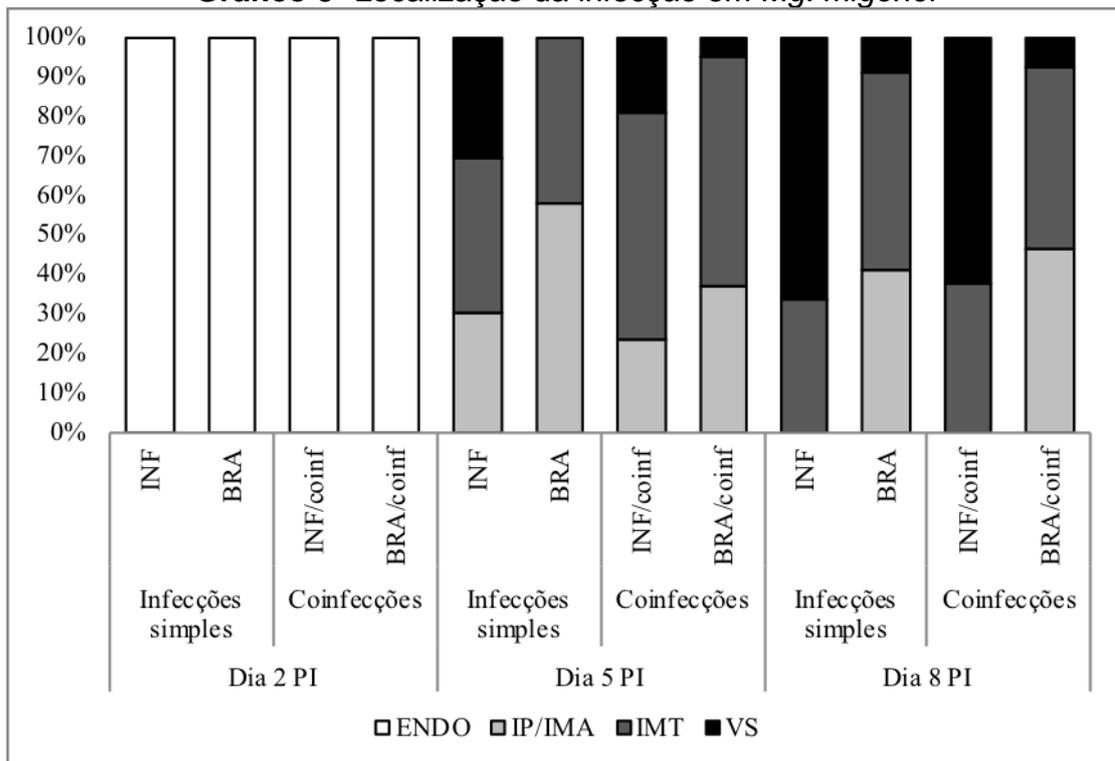
Fonte: A autora, 2019

Legenda: PI- Pós-infecção; INF- *L. (L.) infantum*; BRA- *L. (V.) braziliensis*; Coinf- coinfeção.

Nota: Os números acima das colunas indicam a quantidade de fêmeas analisadas para este ponto.

No dia 8 PI, nas infecções tardias, nas coinfeções, *L. (L.) infantum* se sobrepôs a *L. (V.) braziliensis*, apresentou maiores taxas de infecção (80% e 63%, respectivamente) (Gráfico 3) e colonizou a válvula do estomodeu em grande número. Não houve diferenças estatísticas tanto na taxa de infecção ($X^2 = 1.61$, $df = 1$, $P = 0.20$). Em contraste, as infecções por *L. (V.) braziliensis* foram limitadas ao intestino médio e ao intestino posterior e algumas fêmeas co-infectadas se tornaram negativas para *L. (V.) braziliensis* (Gráfico 5), havendo diferenças estatísticas na localização dos parasitas ($X^2 = 9.1$, $df = 1$, $P = 0.0005$).

Em infecções simples *L. (L.) infantum* evoluiu com sucesso (taxa de infecção 90%), colonizando a cárdia e a válvula do estomodeu (VS), enquanto a *L. (V.) braziliensis* cresceu com menos sucesso (taxa de infecção 68%) e colonizou a VS em duas fêmeas e 11 estavam no IMT, mas não houve diferença estatística ($X^2 = 3.44$, $df = 1$, $P = 0.06$) (Gráfico 5).

Gráfico 5- Localização da infecção em *Mg. migonei*

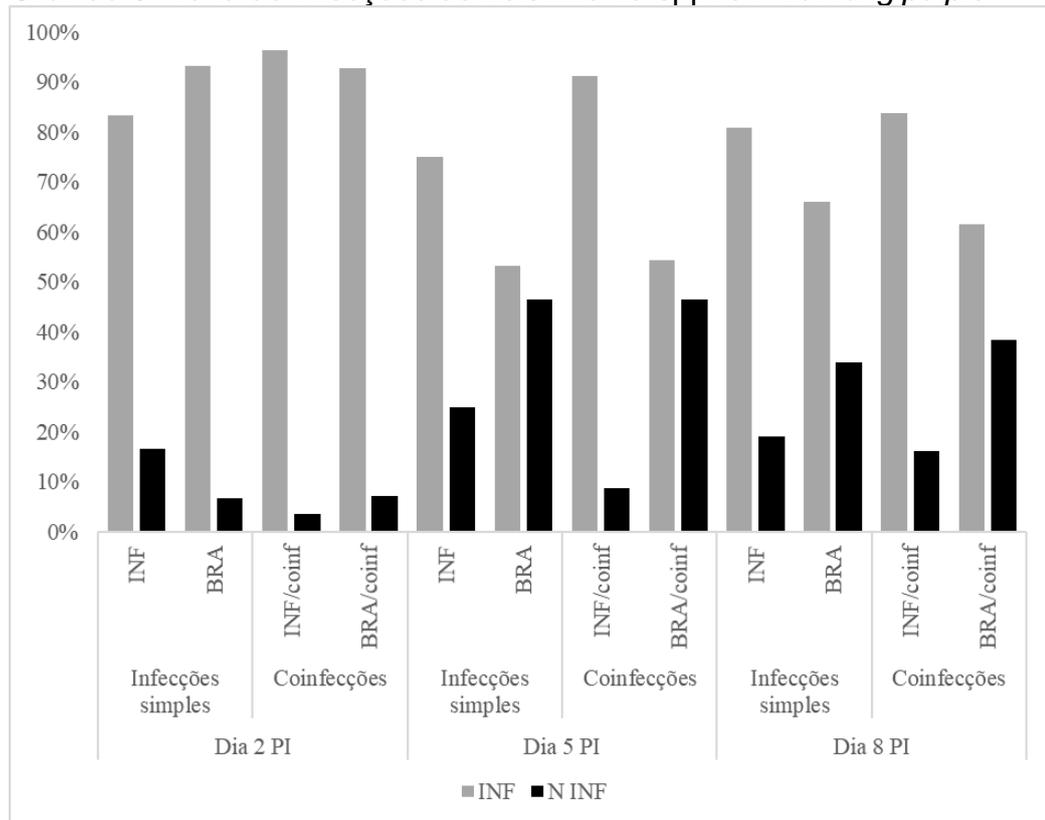
Fonte: A autora, 2019

Legenda: PI- Pós-infecção; INF- *L. (L.) infantum*; BRA- *L. (V.) braziliensis*; Coinf-coinfecção; ENDO- Espaço endoperitrófico; IP- Intestino posterior; IMA- Intestino médio abdominal; IMT- Intestino médio torácico; VS- Válvula do estomodeu.

8.3 Análise e comparação do desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* em infecções simples e coinfeccão em *Lu. longipalpis*

As infecções experimentais em *Lu. longipalpis* foram realizadas em quatro experimentos (alimentações artificiais). A taxa de hematofagia foi de 100% e a taxa de mortalidade variou de 19,5%, 16,5%, 15,5% e (infecções por *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e coinfeccões, respectivamente) (Gráfico 5). Em *Lu. longipalpis*, as duas espécies de parasitos cresceram de maneira semelhante à de *Mg. migonei*. *L. (L.) infantum* cresceu mais rapidamente em todos os estágios da infecção.

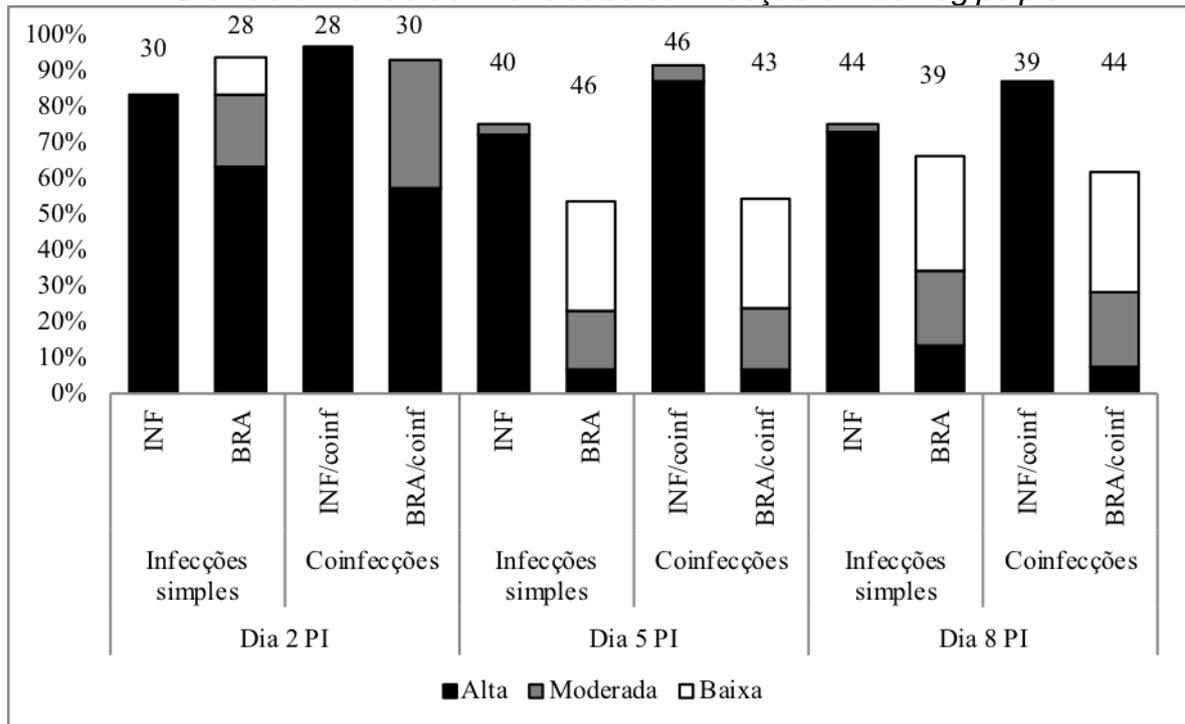
No dia 2 PI, as taxas de infecção foram altas em todas as combinações de parasito-vetor, tanto coinfeccões quanto nas infecções simples, a taxa de infecção foi em torno de 83% (Gráfico 6), e intensidade alta (Gráfico 7) não havendo diferenças estatísticas ($X^2 = 1,46$, $df = 1$, $P = 0,28$) e os parasitos estavam cercados pela matriz peritrófica (espaço endoperitrófico) (Gráfico 8).

Gráfico 6- Taxa de infecções de *Leishmania* spp. em *Lu. longipalpis*

Fonte: A autora, 2021.

No dia 5 PI, na coinfecção foi observado a taxa de infecção de *L. (L.) infantum* alcançando níveis de 91% (Gráfico 6) e mantendo uma intensidade de infecção alta (Gráfico 7), enquanto a taxa de infecção por *L. (V.) braziliensis* não ultrapassou 54% e a intensidade de infecção foi baixa (Gráfico 7). Na infecção por *L. (L.) infantum* os parasitos já estavam presente na cardia e válvula de estomodeu, enquanto que na infecção por *L. (V.) braziliensis* estava no intestino posterior e poucos parasitos no intestino médio abdominal (Gráfico 8).

Nas infecções simples foi possível observar que *L. (L.) infantum* desenvolveu com mais sucesso que *L. (V.) braziliensis* (taxas de infecção 75% e 53%, respectivamente) (Gráfico 6). Infecções por *L. (L.) infantum* foram localizadas no intestino médio abdominal, torácica e cárdia, enquanto as infecções por *L. (V.) braziliensis* na maioria das fêmeas de *Lu. longipalpis* foram concentradas no intestino posterior (Gráfico 8), sendo estatisticamente significativas as diferenças em relação a localização dos parasitos ($X^2= 4,15$, $df= 1$, $P=0,041$).

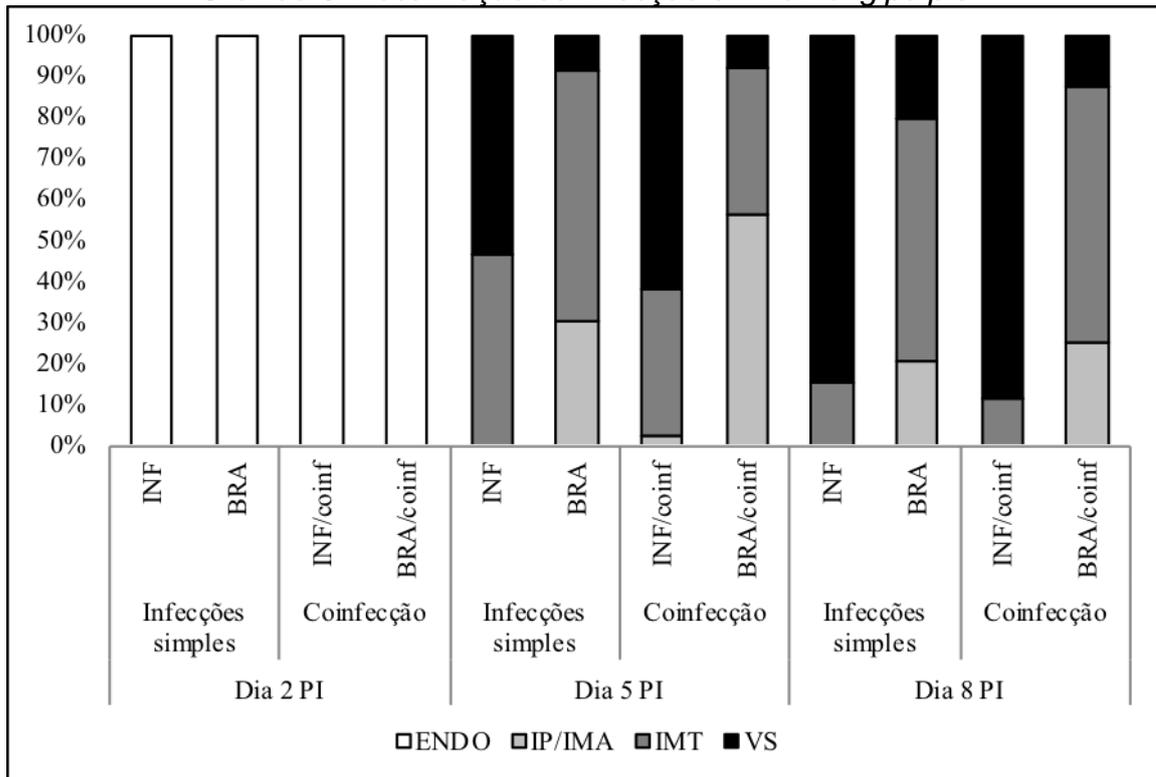
Gráfico 7- Taxas de intensidade da infecção em *Lu. logipalpis*

Fonte: A autora, 2019

Legenda: PI- Pós-infecção; INF- *L. (L.) infantum*; BRA- *L. (V.) braziliensis*; Coinf- coinfeção.

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

O PI de 8 dias, as fêmeas em sua maioria apresentaram infecções altas em *L. (L.) infantum*, a taxa de infecção foi 75% (Gráfico 7 e 6) e os parasitos frequentemente colonizaram a válvula do estomodeu (Gráfico 6). Em *L. (V.) braziliensis* as infecções foram menos intensas, a taxa de infecção foi relativamente menor (66%) e a maioria dos parasitos permaneceram confinados no intestino médio abdominal e ao intestino posterior (Gráfico 6).

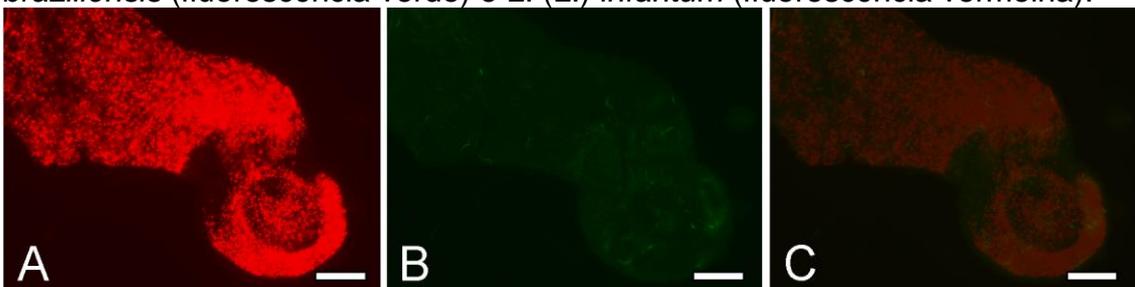
Gráfico 8- Localização da infecção em *Lu. longipalpis*

Fonte: A autora, 2019.

Legenda: PI- Pós-infecção; INF- *L. (L.) infantum*; BRA- *L. (V.) braziliensis*; Coinf-coinfecção; ENDO- Espaço endoperitrófico; IP- Intestino posterior; IMA- Intestino médio abdominal; IMT- Intestino médio torácico; VS- Válvula do estomodeu.

A figura 11 representa a válvula de estomodeu de *Lu. longipalpis*, onde é possível observar a sobreposição da infecção de *L. (L.) infantum* em relação a infecção de *L. (L.) braziliensis* (Fig 12C), além da análise em suas diferentes fluorescências: *L. (L.) infantum* (fluorescência vermelha, fig. 12 A) e *L. (V.) braziliensis* (fluorescência verde, fig. 12B)

Figura 11- Microscopia de fluorescência da cárdia e válvula de estomodeu de fêmea de *Lu. longipalpis* no dia 8 pós-infecção, co-infectada por *L. (V.) braziliensis* (fluorescência verde) e *L. (L.) infantum* (fluorescência vermelha).



Legenda: A- Fluorescência vermelha demonstrando a infecção por *L. (L.) infantum*; B- Fluorescência verde demonstrando a infecção por *L. (V.) braziliensis* e C- Filtro de sobreposição demonstrando a coinfecção.

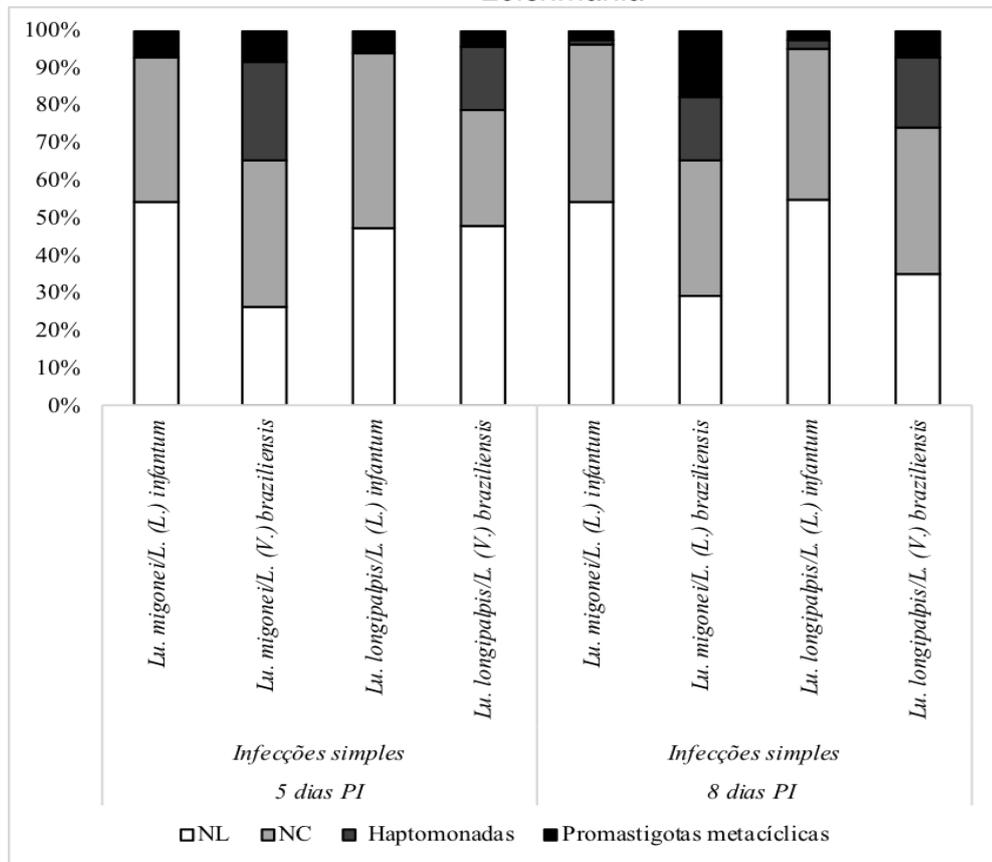
Fonte: A autora, 2018.

8.4 Análise morfométrica e classificação morfológica de *Leishmania* spp.

No dia 5 PI, várias diferenças foram encontradas entre as proporções de formas morfológicas em várias combinações de parasito-vetor. Em *L. (L.) infantum*, as nectomonas longas (NL) foram as formas prevalentes em ambos os vetores, sendo de 55% em *Mg. migonei* e 48% em *Lu. longipalpis*. A infecção de *L. (V.) braziliensis*, do ponto de vista morfológico, diferiu entre as espécies de flebotomíneos: nectomonas longas prevaleceram em *Lu. longipalpis* (48%), mas nectomonas curtas (NC) foram as formas mais numerosas em *Mg. migonei* (39%). As formas metacíclicas foram encontradas em todas as combinações de parasito-vetor, mas em números relativamente baixos, de 7,5 a 8,5% (Gráfico 9).

No dia 8 PI, as diferenças entre as espécies de *Leishmania* foram mais evidentes. Em *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* infectados por *L. (L.) infantum* a maioria dos parasitos estava presente como nectomonas longas enquanto em *Lu. longipalpis* infectados por *L. (V.) braziliensis* as formas predominantes foram nectomonas curtas. As formas metacíclicas foram encontradas em todas as combinações parasito-vetor, a maior proporção (17,5%) foi encontrada em *Mg. migonei* infectado por *L. (V.) braziliensis* (Tabela 1).

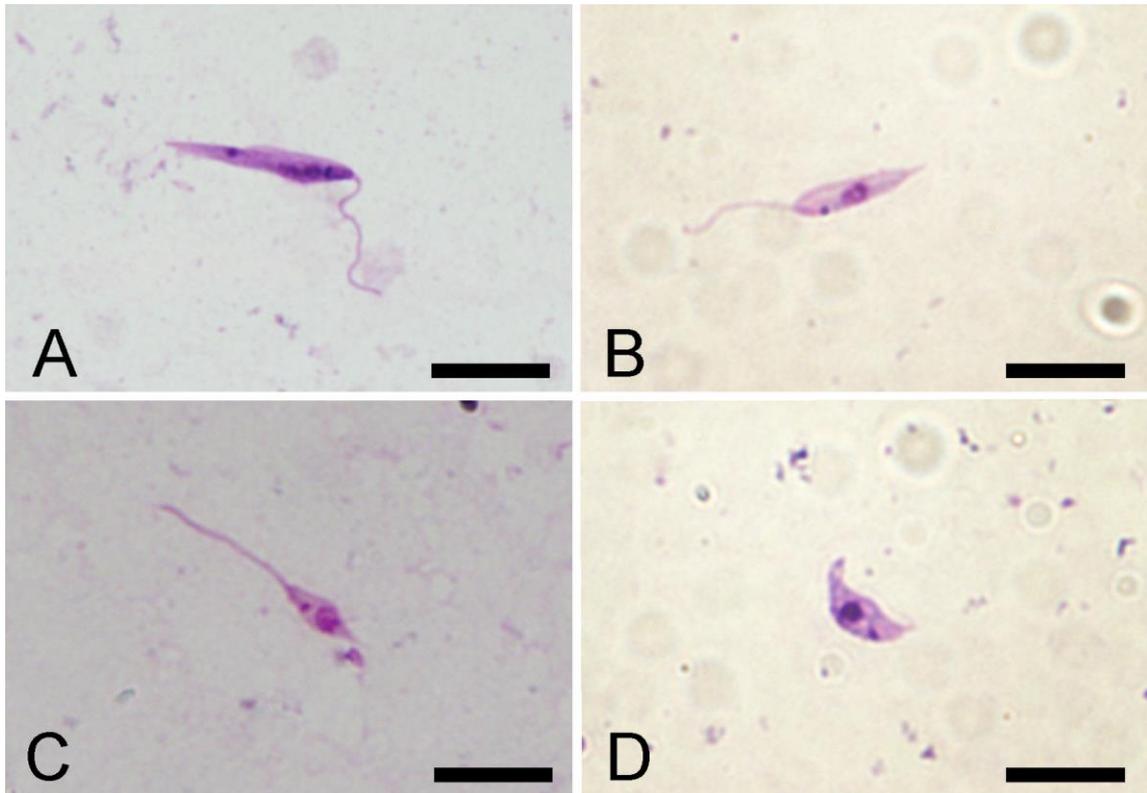
Gráfico 9- Análise morfométrica e classificação morfológica das espécies de *Leishmania*



Legenda: NL- Nectomona alongada; NC- Nectomona curta; PI- Pós infecção; N-número; MIG- *Mg. migonei*
 Fonte: A autora, 2019.

A figura 12 demonstra as formas morfológicas de *Leishmania* spp. durante o desenvolvimento em várias combinações parasito-vetor.

Figura 12- Formas morfológicas de *Leishmania* spp. durante o desenvolvimento nos flebotomíneos



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: A-Nectomona longa de *L. (V.) braziliensis* em *Mg. migonei*; B- Nectomona curta de *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei*; C- Promastigota metacíclica de *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei*; D- Haptomona de *L. (L.) infantum* em *Mg. migonei*.

Nota: Escala de 10 μ m.

Tabela 2- Dimensões das formas morfológicas dos parasitos, descritos no gráfico 7, no 5º e 8º dias PI

Dia PI	Parasito- Vetor	Forma morfológica	N	Comprimento do corpo		Largura do corpo		Comprimento flagelar	
				Média (µm)	Varição (µm)	Média (µm)	Varição (µm)	Média (µm)	Varição (µm)
5	MIG/INF	NL	109	17,3	25,9-14	3	5-1,5	23,8	33,8-17,1
		NC	76	11,9	13,9-7,3	3,1	5,9-1,6	13,11	25,3-3,2
		HAP	0	0	0	0	0	0	0
		MET	15	9,4	13,5-6,7	3,7	5,8-2,0	23,8	33,8-17,1
		TOTAL	200						
	MIG/BRA	NL	53	15,1	21,1-13,0	2,9	4,5-1,8	16,6	30,4-2,8
		NC	78	10,2	12,9-5,7	3,1	5,7-1,2	13,8	23,0-6,0
		HAP	52	9,7	12,8-3,5	3,4	5,9-1,9	5,8	12,1-1,1
		MET	17	9,1	11,8-6,2	3,5	4,5-2,0	20,8	25,5-14,8
		TOTAL	200						
	LON/INF	NL	95	17,4	26,4-14,0	2,3	3,7-1,3	19,1	29,2-5,8
		NC	93	11,3	13,9-6,0	2,2	4,3-1,2	13,2	26,6-2,0
		HAP	0	0	0	0	0	0	0
		MET	12	8,7	11,1-6,4	2,5	3,6-1,6	22,4	28,2-18,0
		TOTAL	200						
	LON/BRA	NL	96	13,2	28,3-16,3	2,9	12,2-1,2	18,4	31,8-3,5
		NC	62	10,7	12,8-5,7	2,9	6,9-1,3	15,4	23,4-7,5
		HAP	33	9,8	12,7-4,9	3	5,9-1,6	7,11	11,9-2,1
		MET	9	8,4	12,2-2,8	3,1	5,6-1,5	21,3	27,9-12,4
		TOTAL	200						
8	MIG/INF	NL	109	16,6	22,5-14	2,8	4,9-1,3	15,2	24,7-2,9
		NC	83	11,8	13,9-6,8	2,7	4,3-1,5	12,3	26,4-3,4
		HAP	3	12,9	13,9-115,5	3	3,1-2,9	2,7	2,9-2,4
		MET	5	8,6	9,5-7,6	2,8	3,3-2,0	19,5	24,7-16,9
		TOTAL	200						
	MIG/BRA	NL	58	15	18,9-13,1	2,9	17,2-1,5	20,9	30,6-2,9
		NC	73	10,8	12,9-5,8	2,4	3,7-1,5	17	24,6-10,2
		HAP	34	9,4	12,5-6,0	2,6	3,8-1,7	5,9	11,9-1,5
		MET	35	9	12,7-4,9	2,6	2,3-1,5	22,7	30,9-14,5
		TOTAL	200						
	LON/INF	NL	110	16,7	24,0-14,0	2,7	5,0-1,3	15,2	26,9-2,3
		NC	80	11,8	13,9-6,1	2,6	5,7-1,6	1,9	2,3-1,2
		HAP	5	11,3	12,2-9,8	2,3	2,8-1,9	11,4	24,6-3,0
		MET	5	9,6	13,2-6,9	3,6	5,1-2,2	23,4	31,1-23,4
		TOTAL	200						
	LON/BRA	NL	70	14,6	21,2-9,4	2,3	5,0-1,6	16,3	30,6-3,6
		NC	78	10,6	12,9-5,5	2,3	5,0-1,3	15,2	23,7-6,2
		HAP	37	10,6	12,7-6,5	2,2	3,5-1,2	6,4	23,7-1,8
		MET	15	10,2	12,9-4,5	2	3,1-1,1	19,9	24,5-15,2
		TOTAL	200						

Fonte: A autora 2019.

Legenda: PI- Pós-infecção; N- número; MIG- *Mg. migonei*; LONG- *Lu. longipalpis*; INF- *L. (L.) infantum*; BRA- *L. (V.) braziliensis*

9 DISCUSSÃO

É essencial a realização de estudos que demonstrem o desenvolvimento de *Leishmania* em flebotomíneos sob condições experimentais para incriminação vetorial, uma vez que apenas estudos moleculares não são suficientes para fornecer informações como viabilidade, localização e estágio de desenvolvimento dos parasitos no vetor. No nosso estudo avaliamos experimentalmente os padrões de desenvolvimento de duas espécies de *Leishmania* spp. em duas espécies de flebotomíneos do Novo Mundo, usando infecções simples e coinfeções (SEBLOVA *et al.*, 2013).

Os estudos de interação vetor-parasito têm utilizado o método de infecção experimental com alimentação sanguínea em animais infectados ou em sistemas de alimentação artificial que podem ser usados para infectar flebotomíneos (FREITAS *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2011; PRUZINOVA *et al.*, 2015; SÁDLOVÁ *et al.*, 2013; SEBLOVA *et al.*, 2015; WARD; LAINSON; SHAW, 1978). É importante salientar que os dois métodos possuem limitações uma vez que a partir dos animais infectados, não é possível controlar o desenvolvimento da infecção, bem como da sua transmissão para os flebotomíneos (VOLF; VOLFOVA, 2011). Em relação a alimentação artificial, método utilizado no presente estudo, algumas espécies de flebotomíneos apresentaram resistência para se alimentarem através da membrana (MANN; KAUFMAN, 2010; SEBLOVA *et al.*, 2015). Porém através deste último método é possível controlar e quantificar alguns fatores, tais como a forma evolutiva e a concentração do parasito utilizada durante a alimentação. Em nosso trabalho a taxa de hematofagia foi entre 75% e 100% em *Mg. migonei* e 100% em *Lu. longipalpis*.

Após a infecção experimental em infecções simples e coinfeções, foi possível acompanhar o ciclo de desenvolvimento das espécies de *Leishmania*, além de sua quantificação e localização durante o período de oito dias, nas duas espécies de flebotomíneos analisadas. Foram utilizadas cepas fluorescentes descritas por Kraeva *et al.* (2015), que permitiram distinguir as espécies de *Leishmania* quando analisadas durante a coinfeção. Em todas as combinações parasito-vetor foi possível observar o êxito da infecção, que pode ser definida como a formação de promastigotas metacíclicas colonizando a válvula de estomodeu. As diferenças encontradas entre os parasitos *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* foram mais

pronunciadas do que as diferenças entre as duas espécies de flebotomíneos investigados. Em particular, *L. (L.) infantum* produziu maiores taxas de infecção e cresceu mais vigorosamente, em comparação com *L. (V.) braziliensis*, em ambos, *Lu. longipalpis* e *Mg. migonei*. As duas espécies de flebotomíneos testadas foram igualmente suscetíveis à infecção por *L. (L.) infantum*, o que confirma os resultados de um estudo anterior (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Os vetores são classificados como vetores específicos e vetores permissivos, com base em sua capacidade de suportar o desenvolvimento tardio de diferentes espécies de *Leishmania* (KAMHAWI, 2006; VOLFF; MYSKOVA, 2007). Vetores específicos, como *P. papatasi*, suportam o desenvolvimento de uma única espécie ou de duas espécies de parasitos intimamente relacionadas (CHAJBULLINOVA *et al.*, 2012; PIMENTA *et al.*, 1994). Por outro lado, vetores permissivos suportam infecções experimentais por uma ampla variedade de *Leishmania* spp. O exemplo mais importante de um vetor permissivo é *Lu. longipalpis*, que esteve envolvido no estabelecimento de *L. (L.) infantum* na América Latina (VOLFF; MYSKOVA, 2007) e é vetor comprovado desse parasito em muitos países, da Costa Rica ao norte da Argentina (DVORAK, SHAW; VOLFF, 2018; LAISON; RANGEL, 2005). A partir desses conceitos e dos nossos resultados é possível afirmar que *Mg. migonei* também deve ser considerado um vetor permissivo, pois as fêmeas desta espécie suportam o desenvolvimento de todas as espécies de *Leishmania* testadas até o momento, a saber *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (GUIMARÃES *et al.*, 2016; NIEVES; PIMENTA, 2000).

No entanto, nosso estudo comparativo revelou que *Mg. migonei* foi mais suscetível a *L. (V.) braziliensis* do que *Lu. longipalpis*. Várias espécies de flebotomíneos são descritas como vetores de *L. (V.) braziliensis* (BRAZIL *et al.*, 2015), inclusive *Mg. migonei*, corroborando assim com os nossos achados. Em estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro (NIEVES; PIMENTA, 2000; PITAPEREIRA *et al.*, 2005) foi detectada a infecção natural de *L. (V.) braziliensis* em *Lu. intermedia*, vetor comprovado para esta espécie (SILVA; GOMES, 2001) e em espécimes de *Mg. migonei*. Nieves e Pimenta (2000) realizaram um estudo de laboratório sobre a suscetibilidade de *Mg. migonei* para *L. (V.) braziliensis* que detectou 77% de positividade para as fêmeas avaliadas. Na literatura também há relatos de infecção natural de *Mg. migonei* por *L. (L.) infantum*, em espécimes coletados no Estado de Pernambuco (GUIMARÃES *et al.*, 2012), e mais

recentemente foi comprovado a susceptibilidade deste flebotomíneo a esta espécie de *Leishmania*, em teste com duas cepas diferentes (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Estes achados reforçam os indícios da participação desta espécie no ciclo de transmissão das leishmanioses e sua permissividade a diversas espécies de *Leishmania*.

Em relação a *Lu. longipalpis*, vetor comprovado de *L. (L.) infantum*, sua permissividade a diversas espécies de *Leishmania* é comprovada. Estudos experimentais relatam a permissividade desse flebotomíneo para várias espécies como *L. braziliensis*, *L. major*, *L. peruviana*, *L. amazonenses* (PIRES, 2014, HLAVACOVA, VOTYPKA, VOLF, 2013). Um estudo realizado na região sudeste do Brasil detectou a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em alguns espécimes silvestres de *Lu. longipalpis* (LANA *et al.*, 2015) e em condições laboratoriais 70% fêmeas de *Lu. longipalpis* desenvolveram infecções tardias de *L. (V.) braziliensis* (HLAVACOVA, VOTYPKA, VOLF, 2013). Nosso estudo observou que a partir da infecção de 5×10^6 promastigotas/mL foi possível gerar um desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis* em *Lu. longipalpis* e foi possível observar a colonização da válvula de estomodeu. Achados que comprovam a sua permissividade ao desenvolvimento de *L. (V.) braziliensis*.

Em infecções únicas e coinfeições, *L. (L.) infantum* se desenvolveu mais rapidamente em ambas as espécies de flebotomíneos do que *L. (V.) braziliensis*. Isso se correlaciona com as curvas de crescimento observadas *in vitro*: durante os três dias iniciais, ambas as espécies cresceram de maneira semelhante, mas a partir do dia 3, *L. (L.) infantum* cresceu significativamente mais rápido. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento no flebotomíneo é afetado não apenas pela suscetibilidade dos vetores, mas também pelas características de crescimento das linhagens estudadas.

Nas infecções em estágio avançado, *L. (L.) infantum* estava presente em todas as regiões do intestino médio, a cárdia e a válvula estomodeal em ambas as espécies de flebotomíneos desde o dia 5 PI, mostrando o tipo típico de desenvolvimento suprapilar. Em estudos descritos na literatura que utilizaram infecções experimentais com *Mg. migonei* infectados por *L. (L.) amazonensis* (NIEVES; PIMENTA, 2000) e *Lu. longipalpis* infectados por *L. (L.) infantum* (FREITAS *et al.*, 2012), espécies com desenvolvimento suprapilares, também demonstraram o estabelecimento da infecção no intestino médio torácico a partir do

5º dia PI. Em contraste, *L. (V.) braziliensis* estava concentrada no intestino posterior e no intestino médio abdominal (desenvolvimento peripilariano). O mesmo acontece nas coinfeções, demonstrando que os dois parasitos concluem seu desenvolvimento e não competem entre si. Estudo anterior com *Mg. migonei* e duas espécies de *Leishmania* (*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*) foram realizados usando apenas infecções simples, as observações de Nieves e Pimenta (2000) onde *L. (L.) amazonensis* (desenvolvimento suprapilaria) cresceu mais rapidamente que *L. (V.) braziliensis* (desenvolvimento peripilariano). Ao compararmos aos experimentos de infecções simples, nossos achados corroboram com o estudo, pois a espécie do subgênero *Leishmania*, *L. (L.) infantum*, também cresce mais rapidamente que a espécie do subgênero *Viannia*, *L. (V.) braziliensis*.

Do ponto de vista epidemiológico, é muito importante a realização de estudos, avaliando o desenvolvimento de duas espécies de parasitos que causam diferentes formas de leishmaniose, principalmente quando coexistem em regiões endêmicas. Ambas as espécies de *Leishmania* completaram o ciclo de vida, produzindo formas infecciosas nas duas espécies de flebotomíneos estudadas. Assim, concluímos que ambos *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis* são igualmente suscetíveis as duas espécies de leishmania. sendo *Mg. migonei* é mais suscetível a a *L. (V.) braziliensis* do que *Lu. longipalpis* sob as condições testadas neste estudo.

10 CONCLUSÕES

A partir de nosso estudo foi possível concluir que em relação às cepas utilizadas, *L. (L.) infantum* teve um crescimento mais rápido em relação a *L. (V.) braziliensis*, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. As análises nos flebotomíneos demonstraram que a forma infectante foi observada em maior número nas infecções por *L. (V.) braziliensis*, o que pode indicar uma efetividade melhor na transmissão deste parasito.

Ao final do trabalho é possível concluir que as duas espécies de flebotomíneos estudadas, *Mg. migonei* e *Lu. longipalpis*, são capazes de suportar a coinfeção de duas espécies de leishmanias, de subgêneros distintos. Estes achados demonstram a capacidade destas espécies de flebotomíneos em atuarem no ciclo de transmissão das leishmanioses no Brasil, tanto da forma tegumentar, quanto da forma visceral.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. P. *et al.* Evaluation of cellular immune responses in patients with different clinical forms of tegumentary Leishmaniasis. **Journal of allergy and clinical immunology**, Saint Louis, v. 14, p. 1-9, 1995.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.003567>. Acesso em: 20 out. 2018.
- AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Plebotominae) in a focus of cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 405-410, 1991.
- BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-347, 2004.
- BASTOS, Thiago Souza Azeredo. **Espécies de flebotomíneos e ecoepidemiologia na cidade de Goiás-GO**, Brasil. 2014.Dissertação (Mestre em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. 2014.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, Omaha, v. 4, p. 601–609, 2004.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 11, n. 4, p. 340-344, 2008.
- BOROVSKY, D.; SCHLEIN, Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 235-242, 1987.
- BRACHO, C. O. *et al.* Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102(5), p. 549-54, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO ELETRÔNICO [DA] SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: **Secretária de Vigilância em Saúde**, v. 10, 2010.

BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 20 dez. 2018.

BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: Jan. 2021.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia. *In*: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 257-274.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE-FILHO, J. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas-a mini review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, Belgica, v. 4, n. 2, p. 1, 2015.

BRITO M. E. F. *et al.* Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: uma avaliação crítica dos estudos realizados no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, n.4, p. 425-445, 2012.

BRITO, M. E. F. *et al.* Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous Leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical medicine and international health**, Oxford, v. 14, p. 1-9, 2009.

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

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

CHAGAS, E., *et al.* Leishmaniose visceral americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 321-385. 1937.

CHAJBULLINOVA A. *et al.* The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. **Parasite and Vectors**, London, v. 5, n. 219, p. 1-8, 2012. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-219>: Acesso em: dez. 2018.

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

CIFUENTES, M.C.B, OSPINO, P.D, ARIAS L.F.C. La *Leishmania* spp. Como estratégia de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis, um artículo de revision. **Investigaciones Andina**, Colômbia, v.9, c.15, p. 64-76, 2007.

COSTA, J. M. L. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. 1 ed. Bahia: Contexto. cap. 13, p. 137-145, 2011.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Leishmania-FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and cellular probes**, London, v. 31, p. 65-69, 2017.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy. **Parasitology research**, London, v. 106, n. 4, p. 857-860, 2010.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 1-25, 2014.

DE AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Regional distribution and habitats of Brazilian phlebotomine species. In: **Brazilian sand flies**, Springer, Cham, p. 251-298, 2018.

DEANE, L. M. E DEANE, M. P. (1954) **Encontro de Leishmania nas visceras e na pele de uma raposa em zona endemic de calazar, nos arredores de Sobral**. O Hospital, Rio de Janeiro, 45,419-421.

DEDET, J. P.; VIGNES, R.; RANGEL, E. F. Morfologia e taxonomia: grupo CIPA. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 2, p. 177-184, 2003.

SOUSA-PAULA, L. C.de *et al.* *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 796-797, 2020.

DOBSON, D. E. *et al.* *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific scg-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. e1001185, 2010.

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

DVORAK V., SHAW J.J.; VOLF P. Parasite Biology: The Vectors, 31-78 In: BRUSCHI, F.; GRADONI, L. (Eds). **The leishmaniasis: old neglected tropical diseases**. Milan: Springer International Publishing, 2018

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 25, p. 209-215, 1960.

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

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

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

GALATI, E. A.B *et al.* Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, p. 115-128, 1996.

GALATI, E. A. B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, 20 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 40-175, 2003.

GOMES, A. C. Sandfly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 457-460, 1994.

GOMES, A. C., S. G. *et al.* Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, de São Paulo, v. 32, p. 105-115, 1990.

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

GUIMARÃES, V. C. F. V. *et al.* *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2016.

Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1444-2>: Acesso em: abril 2018.

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

- GUIMARÃES, V. C. F. V. *et al.* Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 357-360, 2014.
- HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 50, n. 5, p. 955-958, 2013.
- INBAR, E., *et al.* The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. **PLoS genetics**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e1003672, 2013.
- KAMHAWI, Shaden *et al.* A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, Cambridge, v. 119, n. 3, p. 329-341, 2004.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the *Leishmaniases*: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, p. 1-24, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sandflies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia v. 17, p. 279–289, 1999.
- KRAEVA, N. *et al.* *Leptomonas seymouri*: adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co-infection with *Leishmania donovani*. **PloS pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e1005127, 2015.
- LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral Leishmaniasis by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, London, v. 266, p. 628-630, 1977.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p. 311-336.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, London: Academic Press, v. 1, p. 1-120, 1987.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L., BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed). Topley & Wilson's

Microbiology and Microbial Infectious Diseases, v. 5, 9 ed. Londres: Arnould, p. 241-266, 1998.

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

LANA, R. S. *et al.* Phlebotomine sand fly fauna and Leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. **BioMed research international**, London, 2015, <https://doi.org/10.1155/2015/385493> (2015).

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

LANGERON, M. **Précis de microscopie**. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine Saint-Germain, Paris 1949.

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

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis***, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v.104, n.22, p. 9375-9380, 2007.

MAIA, C. *et al.* Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method. **Revista de saúde pública**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 931-937, 2007.

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

MANNA, L. *et al.*, *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MARSDEN, P.D. Mucosal Leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Londres, v. 80, p. 859- 876, 1986.

MARSDEN P.D. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L. (V.) *b* in Três Braços, Bahia–Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, p.93-101, 1994.

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

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.

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

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

MYSKOVA, J. *et al.* A lipophosphoglycan independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 3, p. 317-324, 2007

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **The Special Programme for Research and Training Diseases (TDR)**. Disponível em: <https://www.who.int/Leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 8 jan. 2019.

PIMENTA, P. FILEMON P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. *In*: AUTOR. **Tópicos avançados em Entomologia Molecular**. Minas gerais, 2012. cap, v. 12, p. 1-45.

PIMENTA, P. F. P. *et al.* Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 9155-919, 1994.

PIMENTA, P. F. P. *et al.*, A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, London, v. 115, p. 359-369, 1997.

PIRES, A. C. A. M. **Estudo da susceptibilidade de Lutzomyia (L.) longipalpis com diferentes espécies de Leishmania.** 2014. Dissertação (Mestre em ciências). Centro de Pesquisas René Rachou. 2014.

PITA-PEREIRA, D. *et al.*, Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattini* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral Leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Basel, v.107, p. 66-69, 2008.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009

PRUZINOVA, K. *et al.* Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0128203, 2015.

QUARESMA, P.F. *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London, 105: 579-585, 2011.

RAMALHO-ORTIGÃO, M. R; SARAIVA, E. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. **The Open Parasitology Journal**, Hilversum, v. 4, p. 195-204, 2010.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 291-309.

RANGEL, E. F. *et al.* Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae) em condições experimentais. 1. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous Leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 15, n. 10, p. e19505, 2010.

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

REY, L. Leishmania e leishmaníses: os parasitos. In: **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 15, p. 214-226, 2001.

ROCHA, L.S. *et al.* Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, p. 461-466, 2010.

ROGERS, M.E. *et al.* The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**. London, v.124, p. 495–507, 2002.

ROGERS, M. E. *et al.* Transmission of cutaneous Leishmaniasis by sand flies and enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, London, v. 430, p. 463-467, 2004.

ROGERS, M. *et al.* Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1000555, 2009.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, New York, v. 3, p. 1-13, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00223/full>: Acesso em: Jan. 2018.

ROGERS, M. E., BATES, P.A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 6, p. 818-825, 2007.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, London, v. 124, p. 495-507, 2002.

SACKS, D.L. *et al.* Identification of a infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, Washington, v. 2233, p. 1417-1419, 1984.

SACKS, D. L. *et al.* The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 406-411, 2000.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 453-483, 2001.

SÁDLOVÁ J., *et al.* The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.12, p.1765–1779, 2010.

SADLOVA, J. *et al.* Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. **PloS one**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e19851, 2011.

SÁDLOVÁ, J. *et al.* *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, p. 186-196, 2013.

SÁDLOVÁ, J.; VOLF, P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 337, n. 2, p. 313-325, 2009.

SALOMÓN, O. D. *et al.* *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral Leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, n. 1, p. 84-87, 2010.

SANTOS, S. O. *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Saint Albans, v. 12, n. 3, p. 315- 317, 1998.

SARAIVA, E. M. *et al.* Changes in lipophosphoglycan and gene expression. Associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, London, v. 111, p. 275-287, 1995.

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

SEBLOVA, V. *et al.* *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e2187, 2013.

SEBLOVA, V. *et al.* Natural hybrid of *Leishmania infantum/L. donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism. **Parasites & vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters W & Killick-Kendrick R (Eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, London, Academic Press, v. 1, p. 291-363, 1987.

SHAW J. J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of Leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: Burger JF. **Contributions to the knowledge of Diptera**. Ed. Associated Publishers Florida, USA. p. 503-517, 1999.

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

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E.A. B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2011. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199120113025>: Acesso em: ago.2018

SALES, K. G.S. *et al.* Home sweet home: sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. **Parasites & vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2019.

SILVA, A.C. da; GOMES, A. de C. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, Vianna, 1911. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 187-191, 2001.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p.363-82. 1987.

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

SVÁROVSKÁ, A. *et al.* *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e580, 2010.

VOLF, P. *et al.* Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, p. 1221-1227, 2004.

VOLF, P. *et al.* Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 63, p. 683-686, 2014

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 23, p. 91-92, 2007.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 36, Suppl., p. S1–S9, 2011.

WALTERS, L. L. *et al.* Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 19-39, 1989.

WARD, R. D.; LAINSON R.; SHAW, J. Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v 72, n 3, p.269-276, 1978.

WALTERS, L. L. *et al.* Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 30, n. 4, p. 699-718, 1993.

WILSON, R. *et al.* Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **Plos Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. e816, 2010.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, Florida, v. 54, p. 1-881, 1994.

OPEN **Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis***

Joanna Alexandre¹, Jovana Sadlova², Tereza Lestinova², Barbora Vojtkova², Magda Jancarova², Lucie Podesvova³, Vyacheslav Yurchenko^{3,4}, Filipe Dantas-Torres¹, Sinval P. Brandão-Filho^{1*} & Petr Volf²

Leishmaniasis are neglected tropical diseases and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* are the most important causative agents of leishmaniasis in the New World. These two parasite species may co-circulate in a given endemic area but their interactions in the vector have not been studied yet. We conducted experimental infections using both single infections and co-infections to compare the development of *L. (L.) infantum* (OGVL/mCherry) and *L. (V.) braziliensis* (XB29/GFP) in *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. Parasite labelling by different fluorescein proteins enabled studying interspecific competition and localization of different parasite species during co-infections. Both *Leishmania* species completed their life cycle, producing infective forms in both sand fly species studied. The same happens in the co-infections, demonstrating that the two parasites conclude their development and do not compete with each other. However, infections produced by *L. (L.) infantum* reached higher rates and grew more vigorously, as compared to *L. (V.) braziliensis*. In late-stage infections, *L. (L.) infantum* was present in all midgut regions, showing typical suprapylarian type of development, whereas *L. (V.) braziliensis* was concentrated in the hindgut and the abdominal midgut (peripylarian development). We concluded that both *Lu. migonei* and *Lu. longipalpis* are equally susceptible vectors for *L. (L.) infantum*, in laboratory colonies. In relation to *L. (V.) braziliensis*, *Lu. migonei* appears to be more susceptible to this parasite than *Lu. longipalpis*.

Leishmaniasis are important parasitic diseases, causing serious medical problems in many countries, as they rank in the top-three list of neglected tropical diseases caused by protists¹. The causative agents, flagellates of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), subgenera *Leishmania* and *Viannia*, are transmitted by phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae)².

In Brazil, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* are the most important causative agents of leishmaniasis in humans³. *L. (V.) braziliensis* causes a typical cutaneous leishmaniasis (CL), which may progress to mucosal disease, whereas *L. (L.) infantum* infections is responsible for a life-threatening form of the disease – visceral leishmaniasis (VL). These two parasite species also differ in their development in the sand fly vector; both colonize the sand fly midgut, but only *L. (V.) braziliensis* was documented to colonize the hindgut (peripylarian development)⁴.

¹Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Pernambuco, Brazil. ²Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Life Science Research Centre, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic. ⁴Martinsonsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov University, Moscow, Russia. *email: sinval@cpqam.fiocruz.br

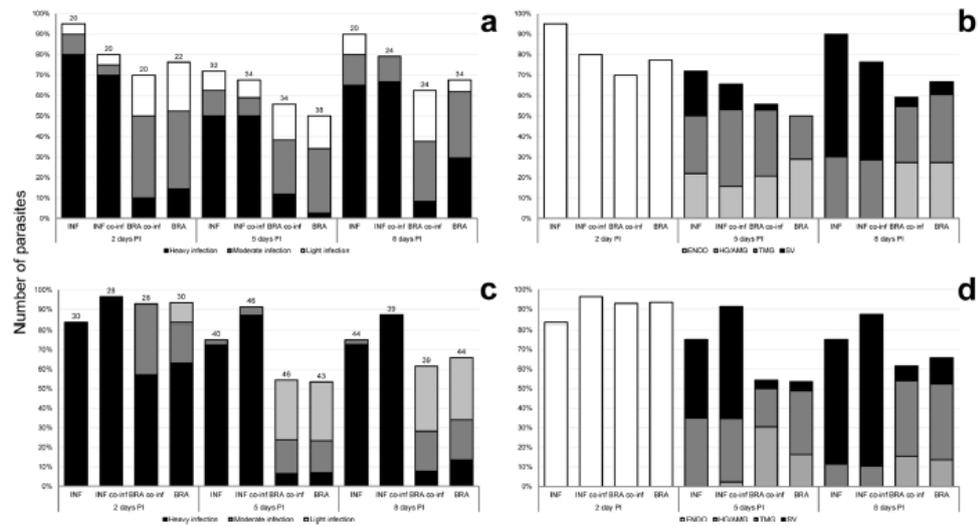


Figure 1. Rates and intensities (a,c) and localization of *Leishmania* spp. (b,d) in *Lu. migonei* (a,b) and *Lu. longipalpis* (c,d) evaluated by fluorescence microscopy. Intensities of infections were classified into three categories: light (<100 parasites/gut), moderate (100–1000 parasites/gut), or heavy (>1000 parasites/gut). PI = post infections, INF = *L. infantum*, BRA = *L. braziliensis*. Columns represent intensity of the *Leishmania* species either in single infections (INF single, BRA single) or in coinfection (INF co-inf, BRA co-inf). Numbers of dissected sand fly females are shown above the bars.

As different parasite species may co-circulate in a given endemic area⁵, the significance of co-infections by different *Leishmania* in sand flies is poorly understood. So far, rather limited number of investigations has been conducted to study the simultaneous development of different *Leishmania* species in the same sand fly^{6,7}. In particular, it would be interesting and important to study simultaneous development of a suprapylarian *Leishmania* and a peripylarian *Viannia*.

The present study was designed to fill this gap in knowledge and conducted experimental co-infections to compare the development of *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* in *Lutzomyia longipalpis*, a known permissive vector^{8,9}, and *Lutzomyia migonei*, which is susceptible to the development of *L. (V.) braziliensis*¹⁰ and to different strains of *L. (L.) infantum*¹¹. Parasite labelling by different fluorescein proteins enabled us to study interspecific competition during co-infections.

Results

Experimental infections of *Lu. migonei*. In total, 322 *Lu. migonei* females were dissected. On day 2 post infection (PI), *L. (L.) infantum* infection rate was 95% and parasites grew very vigorously, whereas *L. (V.) braziliensis* infection rate was 70% and parasites grew slower (Fig. 1a). Both parasite species were restricted to the endoperitrophic space (bloodmeal surrounded by peritrophic matrix) (Fig. 1b). There were no statistically significant differences in the infection rate ($X^2 = 4.29$, $df = 3$, $P = 0.23$).

On day 5 PI, *L. (L.) infantum* infection rate was still high (Fig. 1a), parasites colonized both parts of the midgut (abdominal and thoracic midgut) and, in more than 20% of female sand flies, also the stomodeal valve (Fig. 1b). On the other hand, *L. (V.) braziliensis* infection rate was lower (50%) and parasites colonized only the midgut and the hindgut. Differences in infection rates were non-significant ($X^2 = 4.52$, $df = 3$, $P = 0.21$), whereas differences in the location of the parasites were significant ($X^2 = 6.94$, $df = 1$, $P < 0.01$). Similar differences between *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* were also observed in parasite loads and their localization during coinfections (Fig. 1b).

On day 8 PI, in late stage infections, *L. (L.) infantum* developed very successfully (infection rate 90%), whereas *L. (V.) braziliensis* grew less successfully (infection rate 68%), but there was no statistical difference ($X^2 = 3.44$, $df = 1$, $P = 0.06$). *L. (L.) infantum* colonized the cardia and the stomodeal valve significantly more frequently ($X^2 = 14.43$, $df = 1$, $P < 0.01$), whereas *L. (V.) braziliensis* did not colonize the stomodeal valve at all (Fig. 1b).

Co-infection did not alter the dynamics of infection of the individual parasite species and did not favour or harm any of the parasite species. In co-infections *L. (L.) infantum* produced high infection rates (Fig. 1a) and colonized the stomodeal valve in high numbers (Fig. 2D–F). In contrast, *L. (V.) braziliensis* infections were limited to the midgut and hindgut and some co-infected females became negative for *L. (V.) braziliensis* (Fig. 1b).

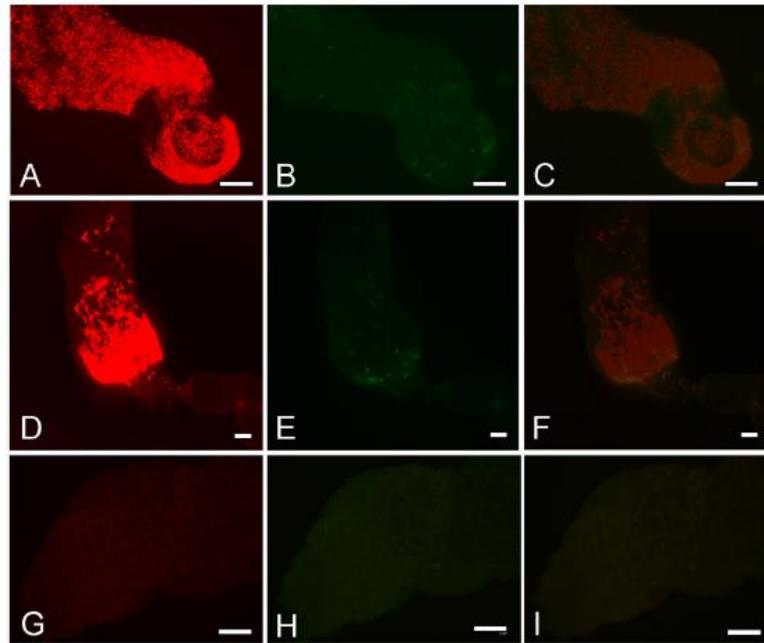


Figure 2. Fluorescence micrographs of thoracic midguts with cardia section and stomodeal valve of *Lutzomyia* spp. females on days 8 postinfection. Cardia of *Lu. longipalpis* (A–C) and *Lu. migonei* (D–F) coinfecting by *Leishmania (Viannia) braziliensis* (green) and *Leishmania (Leishmania) infantum* (red). Control uninfected gut of *Lu. longipalpis* (G–I). (A,D,G) images from red fluorescence, (B,E,H) images from green fluorescence and (C,F,I) merged images, scale bar: 5 mm.

Experimental infections of *Lu. longipalpis*. In total, 457 *Lu. longipalpis* females were dissected. On day 2 PI, infection rates were high in all parasite-vector combination (83%) (Fig. 1c), with parasites present in the endoperitrophic space (Fig. 1d).

On day 5 PI, *L. (L.) infantum* developed more successfully than *L. (V.) braziliensis* (infection rates of 75% and 53%, respectively ($X^2 = 4.16$, $df = 1$, $P = 0.04$; $X^2 = 15.9$, $df = 1$, $P < 0.01$).

On day 8, most of the females of *Lu. longipalpis* infected with *L. (L.) infantum* had a heavy infection rate (75%), whereas in *L. (V.) braziliensis* parasites were less numerous and the infection rate (66%) was significantly lower ($X^2 = 38.09$, $df = 2$, $P < 0.01$) (Fig. 2A–C). *L. (L.) infantum* parasites frequently colonized the stomodeal valve while *L. (V.) braziliensis* infections were mostly limited to in the midgut and pylorus region of the hindgut (Fig. 1d). The same differences in parasite localization were observed in coinfections.

Co-infection did not alter the dynamics of infection of the individual parasite species and did not favour or harm any of the parasite species and the same differences in parasite localization were observed in coinfections.

Morphometric analysis of promastigotes from midgut smears. On day 5 PI, some differences in proportions of morphological forms in various parasite-vector combinations were documented. In *L. (L.) infantum*, elongated nectomonads were the prevailing forms in both vectors (55% *Lu. migonei* and 48% in *Lu. longipalpis*) (Fig. 3), and differences between various vectors were not significant ($X^2 = 3.00$, $df = 2$, $P = 0.22$). On the other hand, significant differences were found between morphological forms of *L. (V.) braziliensis* ($X^2 = 20.95$, $df = 3$, $P < 0.01$) in both vectors: elongated nectomonads (Fig. 4A) prevailed in *Lu. longipalpis* (48%) but short nectomonads (Fig. 4B) were the most numerous forms in *Lu. migonei* (39%). The metacyclic (Fig. 4C) forms were found in all parasite-vector combinations but in relatively low numbers, from 7.5 to 8.5% (Table 1).

On day 8 PI, differences between *Leishmania* species were more pronounced: in *Lu. migonei* and *Lu. longipalpis* infected by *L. (L.) infantum* the majority of parasites were present as elongated nectomonads, whereas in *Lu. migonei* and *Lu. longipalpis* infected by *L. (V.) braziliensis* the prevailing forms were short nectomonads (Fig. 3). Metacyclic forms were found in all parasite-vector combinations, the highest proportion (17.5%) were found in *Lu. migonei* infected by *L. (V.) braziliensis* (Table 1).

Comparison of growth curves *in vitro*. To investigate the *in vitro* growth of *Leishmania* spp., the cultures were maintained at a temperature 26 °C. For both parasite species, the initial doses were 10^4 promastigotes/ml and 10^5 promastigotes/ml and the cells were cultivated for seven days. The growth of the parasites in culture was

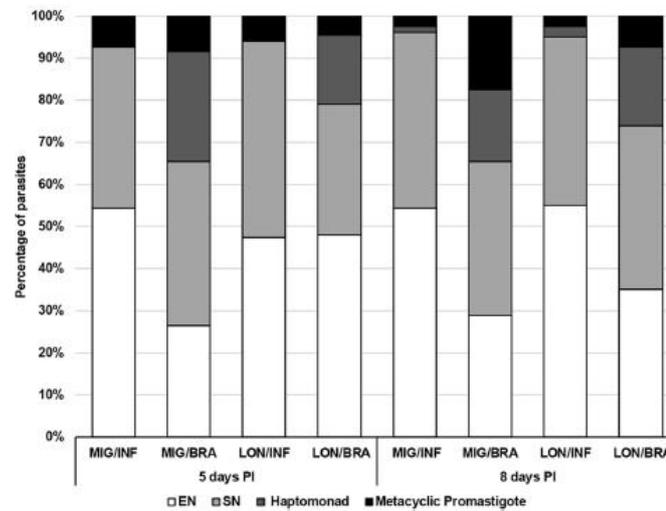


Figure 3. Morphological forms of *Leishmania* spp. during development in *Lutzomyia* spp. Morphological forms of *Leishmania* parasites in *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis* were evaluated by light microscopy using oil-immersion objective on days 5 and 8 postinfection. MIG (*Lu. migonei*), BRA (*L. (V.) braziliensis*), LONG (*Lu. longipalpis*), INF (*L. (L.) infantum*), EN (elongated nectomonads), SN (short nectomonads).

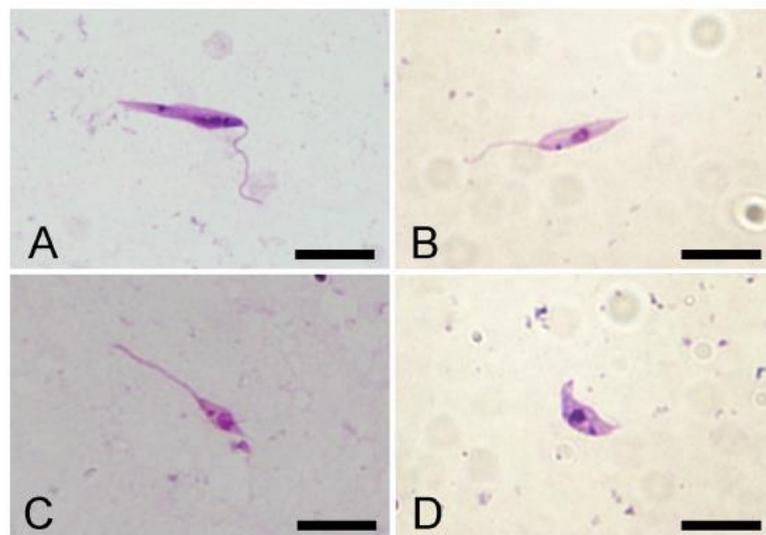


Figure 4. Morphological forms of *Leishmania* occurring in sand fly midgut of *Lu. migonei*. Scale bar 10 μ m. (A) Elongated nectomonad of *L. (V.) braziliensis* in *Lu. migonei*; (B) Short nectomonad of *L. (L.) infantum* in *Lu. migonei* (C) Metacyclic promastigote of *L. (L.) infantum* in *Lu. migonei*; (D) haptomonads of *L. (L.) infantum* in *Lu. migonei*.

similar to that occurring in the phlebotomine sand flies: *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* grew similarly until the third day of cultivation (Fig. 5a,b), there were no statistical differences (the initial dose of 10^4 : $X^2 = 2.46$, $df = 3$, $P = 0.48$, the initial dose of 10^5 : $X^2 = 6.77$, $df = 3$, $P = 0.08$). From day 4 PI, *L. (V.) braziliensis* grew slower

Day PI	Parasite-vector	Morphological form	n	Body length		Body width		Flagellar length	
				Mean (μm)	Range (μm)	Mean (μm)	Range (μm)	Mean (μm)	Range (μm)
5	MIG/INF	EN	109	17.3	25.9-14	3	5.2-1.5	23.8	33.8-17.1
		SN	76	11.9	13.9-7.3	3.1	5.9-1.6	13.11	25.3-3.2
		HAP	0	0	0	0	0	0	0
		MET	15	9.4	13.5-6.7	3.7	5.8-2.0	23.8	33.8-17.1
	MIG/BRA	EN	53	15.1	21.1-13.0	2.9	4.5-1.8	16.6	30.4-2.8
		SN	78	10.2	12.9-5.7	3.1	5.7-1.2	13.8	23.0-6.0
		HAP	52	9.7	12.8-3.5	3.4	5.9-1.9	5.8	12.1-1.1
	LON/INF	MET	17	9.1	11.8-6.2	3.5	4.5-2.0	20.8	25.5-14.8
		EN	95	17.4	26.4-14.0	2.3	3.7-1.3	19.1	29.2-5.8
		SN	93	11.3	13.9-6.0	2.2	4.3-1.2	13.2	26.6-2.0
		HAP	0	0	0	0	0	0	0
	LON/BRA	MET	12	8.7	11.1-6.4	2.5	3.6-1.6	22.4	28.2-18.0
		EN	96	13.2	28.3-16.3	2.9	12.2-1.2	18.4	31.8-3.5
		SN	62	10.7	12.8-5.7	2.9	6.9-1.3	15.4	23.4-7.5
		HAP	33	9.8	12.7-4.9	3	5.9-1.6	7.11	11.9-2.1
		MET	9	8.4	12.2-2.8	3.1	5.6-1.5	21.3	27.9-12.4
8	MIG/INF	EN	109	16.6	22.5-14	2.8	4.9-1.3	15.2	24.7-2.9
		SN	83	11.8	13.9-6.8	2.7	4.3-1.5	12.3	26.4-3.4
		HAP	3	12.9	13.9-11.5	3	3.1-2.9	2.7	2.9-2.4
		MET	5	8.6	9.5-7.6	2.8	3.3-2.0	19.5	24.7-16.9
	MIG/BRA	EN	58	15	18.9-13.1	2.9	17.2-1.5	20.9	30.6-2.9
		SN	73	10.8	12.9-5.8	2.4	3.7-1.5	17	24.6-10.2
		HAP	34	9.4	12.5-6.0	2.6	3.8-1.7	5.9	11.9-1.5
	LON/INF	MET	35	9	12.7-4.9	2.6	2.3-1.5	22.7	30.9-14.5
		EN	110	16.7	24.0-14.0	2.7	5.0-1.3	15.2	26.9-2.3
		SN	80	11.8	13.9-6.1	2.6	5.7-1.6	1.9	2.3-1.2
		HAP	5	11.3	12.2-9.8	2.3	2.8-1.9	11.4	24.6-3.0
	LON/BRA	MET	5	9.6	13.2-6.9	3.6	5.1-2.2	23.4	31.1-23.4
		EN	70	14.6	21.2-9.4	2.3	5.0-1.6	16.3	30.6-3.6
		SN	78	10.6	12.9-5.5	2.3	5.0-1.3	15.2	23.7-6.2
		HAP	37	10.6	12.7-6.5	2.2	3.5-1.2	6.4	23.7-1.8
		MET	15	10.2	12.9-4.5	2	3.1-1.1	19.9	24.5-15.2

Table 1. Promastigotes from gut smears were measured under light microscopy with an oil-immersion objective. MIG (*Lutzomyia migonei*). BRA (*Leishmania (Viannia) braziliensis*). LONG (*Lutzomyia longipalpis*). INF (*Leishmania (Leishmania) infantum*). PI (postinfection). EN (elongated nectomonads). SN (short nectomonads). HAP (haptomonads). MET (metacyclic promastigotes).

compared to *L. (L.) infantum*. The differences were statistically significant (the initial dose 10^4 : $X^2 = 256.2$, $df = 6$, $P < 0.01$, the initial dose 10^5 : $X^2 = 95.1$, $df = 6$, $P < 0.01$).

Discussion

We evaluated the developmental patterns of two *Leishmania* spp. in two New World phlebotomine sand fly species, using both single infections and co-infections. Differences found between *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* were more pronounced than the differences between *Lutzomyia* species. In particular, *L. (L.) infantum* produced higher infection rates and grew more vigorously, as compared to *L. (V.) braziliensis*, in both *Lu. longipalpis* and *Lu. migonei*. Both sand fly species tested were similarly susceptible to infection by *L. (L.) infantum*, which confirms previous findings¹¹.

Sand fly vectors have been classified into two categories, specific vectors and permissive vectors, based on their ability to support late-stage development of different *Leishmania* species^{8,9}. Specific vectors, like *Phlebotomus papatasi* support development of a single parasite species or two closely related parasite species^{6,12}. In contrast, permissive vectors support experimental infections by a broad range of *Leishmania* spp. The most important example of a permissive vector is *Lu. longipalpis*, which was involved in the establishment of *L. (L.) infantum* in Latin America⁹ and is proven vector of this parasite in many countries, from Costa Rica to northern Argentina^{5,13}. Here we confirmed that *Lu. migonei* should be also considered as the permissive vector, as females of this species support the development of all *Leishmania* species tested so far, namely *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*^{10,11}.

Nevertheless, our detailed comparative study revealed that *Lu. migonei* was more susceptible to *L. (V.) braziliensis* than *Lu. longipalpis*. Previously, several sand fly species were described as vectors of *L. (V.) braziliensis*¹⁴,

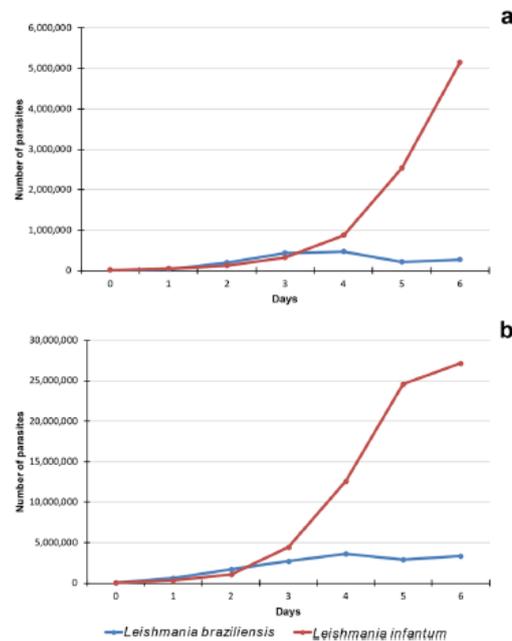


Figure 5. The curve growth of *Leishmania* spp. cultures at days 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6. Two initial concentrations were used for each *Leishmania* species. (a) Initial dose (at day 0) of 10^4 promastigotes/ml; (b) Initial dose (at day 0) of 10^5 promastigotes/ml.

but the role of *Lu. longipalpis* and *Lu. migonei* in the circulation of this parasite was unknown⁵. Natural infections of *Lu. migonei* by *L. (V.) braziliensis* were repeatedly found in the Rio de Janeiro State^{10,15}. Nieves and Pimenta¹⁰ conducted a laboratory study on susceptibility of *Lu. migonei* to *L. (V.) braziliensis* resulting in 77% positivity of the dissected females. *Lu. longipalpis* carrying DNA of *L. (V.) braziliensis* has been described in the South-Eastern region of Brazil¹⁶ and in laboratory conditions 70% of *Lu. longipalpis* females developed late stage infections of *L. (V.) braziliensis*¹⁷.

In single infections and co-infections, *L. (L.) infantum* developed more rapidly in both sand fly species than *L. braziliensis*. This correlates with growth curves we observed *in vitro*: during initial three days both species grew similarly, but then, from day 3 onwards, *L. (L.) infantum* grew significantly faster. These results suggest that development in the sand fly is affected not only by the susceptibility of the vectors, but also by the growth characteristics of the studied strains. In late-stage infections, *L. (L.) infantum* was present in all midgut regions, the cardia and stomodeal valve in both sand fly species from day 5 PI, showing typical suprapylarian type of development. In contrast, *L. (V.) braziliensis* was concentrated in the hindgut and the abdominal midgut (peripylarian development). The same happens in the co infections, demonstrating that the two parasites conclude their development and do not compete with each other. Previous study with *Lu. migonei* and two *Leishmania* species was done using single infections only, but observations by Nieves and Pimenta¹⁰ were similar to our results: suprapylarian *L. (L.) amazonensis* grew faster than peripylarian *L. (V.) braziliensis*. This interspecific difference appears to be strain-independent as almost identical patterns of development were described for the *L. (V.) braziliensis* strain m2903¹⁰ and for two different *L. (L.) infantum* strains M4192 and CUK3 in *Lu. migonei*¹¹.

From an epidemiological point of view, it is very important to carry out studies, assessing the development of two species of parasites that cause different forms of leishmaniasis, especially when they coexist in endemic regions¹⁸. Both *Leishmania* species completed the life cycle, producing infective forms in both sand fly species studied. We conclude that both *Lu. migonei* and *Lu. longipalpis* are equally susceptible vectors for *L. (L.) infantum*, in laboratory colonies. In relation to *L. (V.) braziliensis*, *Lu. migonei* appears to be more susceptible to this parasite than *Lu. longipalpis*.

Material and Methods

Sand fly colonies and *Leishmania* strains. Established laboratory colonies of *Lu. longipalpis* (from Jacobina, Brazil) and *Lu. migonei* (from Baturité, Brazil) were used and maintained under standard conditions, as previously described¹⁹. A fluorescent strains of *L. (V.) braziliensis* (XB29 marked with GFP) and *L. (L.) infantum* (OGVL marked with mCherry) by stable integration of mCherry into the 18S rRNA locus as previously described²⁰. We have used parasites within less than 10 passages *in vitro* and were maintained at 23 °C on Medium

199 (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific, USA), 1% BME vitamins (Sigma-Aldrich), 2% human urine and 250 µg/ml amikacin (Bristol-Myers Squibb, USA).

For study of growth curves *in-vitro*, two initial doses were used: 10^6 promastigotes/ml and 10^5 promastigotes/ml. The concentration of parasites was analyzed daily for 7 days, using counting in Burkler chamber. The experiments were repeated twice.

Experimental infections of sand flies. Female sand flies (3–6 days old) of both species were fed through a chick-skin membrane on heat-inactivated rabbit blood containing 10^6 promastigotes/ml for single infections and 5×10^5 of each species for co-infections (half a dose used in single infections). Three groups of females of *Lu. migonei* were studied, the first infected with *L. (V.) braziliensis* (XB29 marked with GFP), the second with *L. (L.) infantum* (OGVL marked with mCherry) and the third co-infected with both *Leishmania* species. The same procedure was performed with *L. longipalpis*. Engorged females were separated and maintained in the same conditions as the colony and dissected on days 2, 5 and 8 post-infection (PI). Individual guts were placed into a drop of saline and analyzed by fluorescence microscopy for the localization, infection intensity and morphology of *Leishmania* infections. Parasite loads were graded according to Myskova *et al.*²¹ as light (< 100 parasites per gut), moderate (100 to 1000 parasites per gut) and heavy (> 1000 parasites per gut). The experiments were repeated four times.

Morphometry of parasites. Smears from midguts of *Lu. migonei* and *Lu. longipalpis* infected with *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis*, alone or in combination (i.e., co-infected) were prepared on days 5 and 8 PI, being fixed with methanol and stained with Giemsa. Stained smears were then examined under a light microscope with an oil-immersion objective and photographed with an Olympus D70 camera (Olympus, Hong-Kong, China). Body length, body width and flagellar length of 200 randomly selected promastigotes from four females/smears were measured for each sand fly species and time intervals using Image-J 1.x software. Promastigote forms were distinguished according to Walters *et al.*²² and Sadlova *et al.*²³. *L. (L.) infantum*, developmental forms were identified as follows: (i) elongated nectomonads (body length ≥ 14 µm) (ii) short nectomonads (body length < 14 µm and flagellar length ≤ 2 times body length); (iii) metacyclic promastigotes (body length < 14 µm and flagellar length ≥ 2 times body length); and (iv) haptomonads (flagellum 0–3 µm, present during the late stage infections in cardia). *L. (V.) braziliensis*, developmental forms were identified as follows: (i) elongated nectomonads (body length ≥ 13 µm); (ii) short nectomonads (body length < 13 µm and flagellar length ≤ 2 times body length); (iii) metacyclic promastigotes (body length < 13 µm and flagellar length ≥ 2 times body length); and (iv) haptomonads (flagellar length \leq body length, present in hind gut and cardia).

Ethical approval. Animals used for blood-feeding of sand fly colonies were maintained and handled in the animal facility of Charles University in Prague, in accordance with institutional guidelines and Czech legislation (Act of the Czech National Assembly on the Protection of Animals Against Cruelty No. 246/1992, latest amendment No. 359/2012), which complies with all relevant European Union guidelines for experimental animals. All experiments were approved by the Committee on the Ethics of Laboratory Experiments of the Charles University in Prague and were performed under the Certificate of Competency (Registration Number: CZ 03069).

Received: 7 May 2019; Accepted: 11 February 2020;

Published online: 27 February 2020

References

1. Fenwick, A. The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health* **126**, 233–6 (2012).
2. Maroli, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* **27**, 123–47 (2013).
3. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* **7**, e35671 (2012).
4. Lainson, R., Ready, P. D. & Shaw, J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond.* **206**, 307–18 (1979).
5. Dvorak, V., Shaw, J. J. & Volf, P. Parasite biology: The vectors. In *The leishmaniases: Old neglected tropical diseases* (ed. Bruschi, F. & Gradoni, L.) 31–78 (Springer International Publishing, 2018).
6. Chajbullinova, A. *et al.* The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasit. Vectors* **5**, 219 (2012).
7. Inbar, E. *et al.* The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *Plos Genet.* **9**, e1003672 (2013).
8. Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* **22**, 439–45 (2006).
9. Volf, P. & Myskova, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.* **23**, 91–92 (2007).
10. Nieves, E. & Pimenta, P. F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **37**, 134–40 (2000).
11. Guimarães, V. C. F. *et al.* *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit. Vectors* **9**, 159 (2016).
12. Pimenta, P. F. *et al.* Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9155–9 (1994).
13. Lainson, R. & Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**, 811–27 (2005).
14. Brazil, R. P. *et al.* Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas—A mini review. *Entomol. Ornithol. Herpetol.* **4**, 144 (2015).
15. Pita-Pereira, D. *et al.* Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 905–13 (2005).
16. Lana, R. S. *et al.* Phlebotomine sand fly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. *BioMed Res Int.* **2015**, <https://doi.org/10.1155/2015/385493> (2015).

17. Hlavacova, J., Votypka, J. & Volf, P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. *J. Med. Entomol.* **50**, 955–8 (2013).
18. Dantas-Torres, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* **170**, 313–317 (2010).
19. Volf, P. & Volfova, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* **36**(Suppl 1), S1–S9 (2011).
20. Kraeva, N. et al. *Leptomonas seymouri*: adaptations to the dixenous life cycle analyzed by genome sequencing, transcriptome profiling and co-infection with *Leishmania donovani*. *Plos Path.* **11**(8), e1005127 (2015).
21. Myskova, J., Votypka, J. & Volf, P. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *J. Med. Entomol.* **45**, 133–13 (2008).
22. Walters, L. L. et al. Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 19–39 (1989).
23. Sadlova, J. et al. The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cell Microbiol.* **12**, 1765–79 (2010).

Acknowledgements

This study was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number CNPq-PVE-CsF 400699/2014-1), Research Center UNCE 204072 to T.L. and M.J., Grant Agency of the Czech Republic (grant number 17-10656S) and Russian Science Foundation (grant 19-15-00054, (establishing of fluorescent *Leishmania* strain) to V.Y., and by ERD funds MSMT CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000759 to P.V., V.Y. and J.S. F.D.T. is the recipient of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 313118/2018-3).

Author contributions

P.V. and J.S. designed the study. S.P.B.F. and P.V. were responsible for the financial support of the project. J.A., J.S., T.L., L.P., B.V., V.Y. and M.J. conducted the laboratory work, including establishing of the fluorescent strains of parasites, conducting of sand fly infections and dissections. J.A. and J.S. contributed to data analysis. J.A., P.V. and F.D.T. drafted the manuscript; all authors read, discussed and approved the final version of the paper

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P.B.-F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Apêndice B- Artigo 2

Journal of the American Mosquito Control Association, 37(2):98–100, 2021
Copyright © 2021 by The American Mosquito Control Association, Inc.

SCIENTIFIC NOTE

BILATERAL ANOMALY IN A MALE OF *EVANDROMYIA LENTI* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN PERNAMBUCO, BRAZIL

DÉBORA ELIENAI DE OLIVEIRA MIRANDA,¹ JOANNA ALEXANDRE,¹ FERNANDO JOSÉ DA SILVA,¹ JOSÉ DILERMANDO ANDRADE FILHO,² FILIPE DANTAS-TORRES,¹ AND SINVAL PINTO BRANDÃO-FILHO¹

ABSTRACT. More than 1,000 species of phlebotomine sand flies have been described in the literature, many of which are vectors of *Leishmania* spp. In addition to the morphological similarities between some species groups, the occurrence of anomalies within one species may lead to erroneous description of new taxa. This study describes a case of bilateral anomaly in the number of spines in the gonostyle in a male of *Evandromyia lenti*. In this anomalous male, a 5th spine is present between the upper external spine and the lower external spine. The occurrence of such an anomaly can potentially result in misidentifications in this important group of insects.

KEY WORDS Anomaly, *Lutzomyia lenti*, gonostyle, identification, taxonomy

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are small insects of major medical and veterinary significance, due to the bloodfeeding habits of the females. More than 1,000 species of phlebotomine sand flies have been described to date, many of which are recognized vectors of *Leishmania* spp. (Maroli et al. 2013). In the Americas, there are around 530 species and >20 species have been listed as vectors of *Leishmania* spp. to humans in this region (Maroli et al. 2013, Brazil et al. 2015, Shimabukuro et al. 2017).

Phlebotomine sand fly identification is mostly based on morphological features. Many species belonging to certain genera, or species groups, are morphologically similar, which in turn makes their identification a complex task (Galati 2018). In addition, misidentifications may result in wrong conclusions about the geographical distribution and even the vector role of a given species (Andrade Filho et al. 2004, Cutolo et al. 2009). Morphological anomalies have been documented in phlebotomine sand flies around the world (Kassem et al. 1988, Marcondes 1999, Florin et al. 2010). For instance, anomalies can occur in the antennae, palpomeres, male terminalia, and female spermathecae. These anomalies may eventually lead to misidentifications, including the wrong description of a new species (e.g., Mangabeira 1942). Nonetheless, the biological impact of such anomalies (e.g., on sexual behavior and reproduction) remains poorly understood. Considering the eminent taxonomic implications of morphological anomalies in phlebotomine sand flies,

we describe herein a case of morphological anomaly in a male of *Evandromyia lenti* (Mangabeira).

This anomalous male was found during one of a series of phlebotomine sand fly collections conducted in Salgadinho Village, Pesqueira municipality (8°16.47'S, 36°40.2'W; 709 m above sea level), Pernambuco State, northeastern Brazil. The climate of Pesqueira is semiarid, with an average annual rainfall of 53.3 mm and an average annual temperature of 23.8°C (data obtained from Instituto de Tecnologia de Pernambuco meteorological station: 82890). The vegetation is predominantly composed of semideciduous and deciduous forests.

Sand fly collections were performed under the framework of different research projects in January 2017, July 2018, and January 2019. During 2 consecutive nights of each month, Centers for Disease Control and Prevention light traps (2 per night) were installed from 5:00 p.m. to 6:00 a.m., positioned 1.5 m above the ground in the peridomicile (chicken coop) of a house. The anomalous male and additional phlebotomine sand flies collected were identified morphologically and classified according to Galati (2018). The specimens were prepared as microscopy slides, and examined by light microscopy. The following structures were observed: first 3 flagellomeres, palps, labrum–epipharynx, clypeus, sperm pump (= ejaculatory pump), aedeagal ducts (= genital filaments), epandrial lobes (= lateral lobes), parameres, gonocoxites, and gonostyles were also analyzed. The anomalous male described herein is deposited (accession number: 91.623) in the collection of sand flies (FIOCRUZ-COLFLEB) of René Rachou Institute (Fiocruz), Minas Gerais, Brazil. We also compared the anomalous male to a normal male from Lassance, Minas Gerais, the type locality of *E. lenti*, which is deposited in the FIOCRUZ-COLFLEB collection (accession number: 81.272).

¹ Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, 50740-465 Pernambuco, Brazil.

² René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, 30190-009 Minas Gerais, Brazil.

Apêndice C- Artigo 3

Parasitology Research (2021) 120:2681–2687
<https://doi.org/10.1007/s00436-021-07195-8>

PROTOZOOLOGY - SHORT COMMUNICATION



Molecular epidemiology and prevalence of babesial infections in dogs in two hyperendemic foci in Brazil

Filipe Dantas-Torres¹ · Joanna Alexandre¹ · Débora Elienai de Oliveira Miranda¹ · Luciana Aguiar Figueredo¹ · Kamila Gaudêncio da Silva Sales¹ · Lucas Christian de Sousa-Paula¹ · Lidiane Gomes da Silva² · Guilherme Ribeiro Valle³ · Vitor Márcio Ribeiro³ · Domenico Otranto⁴ · Katrin Deuster⁵ · Matthias Pollmeier⁵ · Gertraut Altreuther⁵

Received: 17 February 2021 / Accepted: 24 May 2021 / Published online: 10 June 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Babesial parasites are some of the most ubiquitous blood pathogens and consequently have considerable worldwide veterinary impact. Dogs living in the tropics are highly exposed to babesial parasites, particularly to *Babesia vogeli*. Limited data on the seroprevalence and molecular prevalence of *Babesia* spp. in dogs are available in Latin America. We conducted a cross-sectional study combining serological and molecular tests to estimate the seroprevalence and molecular epidemiology of *Babesia* spp. infections in dogs in two hyperendemic foci in Brazil. A total of 630 privately owned dogs (417 from Goiana municipality, Pernambuco state, north-eastern Brazil, and 213 from São Joaquim de Bicas municipality, Minas Gerais state, south-eastern Brazil) were sampled and molecularly and serologically tested for *Babesia* spp. Overall, 519 dogs (82.4%) presented detectable IgG antibodies against *Babesia* spp., and seropositivity was significantly higher in dogs older than 1 year. Molecularly, 34 dogs (5.4%) were positive for a ~ 200 bp fragment of the *18S rRNA* gene of *Babesia* spp. and 88 (14.0%) for a longer fragment (~ 450 bp) of the same gene of *Babesia* spp. and other protozoa. The *18S rRNA* gene sequences generated herein corresponded to *B. vogeli* ($n=52$) or *Hepatozoon canis* ($n=20$). This study confirms a high level of exposure to *B. vogeli* in two areas of Brazil and highlights that most of the dogs living in these areas are infected during the course of their life, reflected by increased seroprevalence in older dogs. Increased awareness and prevention of tick-borne protozoa infections in dogs from Brazil and Latin America are urgently needed.

Keywords Age · *Babesia* · Dogs · Molecular epidemiology · Risk factor · Seroprevalence

Section Editor: Dana Mordue

✉ Filipe Dantas-Torres
filipe.torres@fiocruz.br

¹ Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil

² Centro Universitário do Vale do Ipojuca (UNIFAVIP/Wyden), Caruaru, Pernambuco, Brazil

³ Veterinary School, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Betim, Brazil

⁴ Department of Veterinary Medicine, Università Degli Studi di Bari, Valenzano, Italy

⁵ Elanco Animal Health, Monheim, Germany

Introduction

Canine babesiosis is a clinically relevant disease of dogs, which affects disproportionately dogs living in the tropics (Panti-May and Rodríguez-Vivas 2020). Scientific evidence gathered during the past decades unravelled that dogs can be infected by an expanding number of recognized babesial species (Baneth et al. 2019, 2020; Penzhorn, 2020). Nonetheless, *Babesia vogeli* remains as the most widespread species globally, which may be partly explained by the vast geographical distribution of its tick vectors (Dantas-Torres et al. 2018).

Canine babesiosis is widely distributed and highly endemic in tropical regions (Maggi and Krämer 2019; Panti-May and Rodríguez-Vivas 2020). For instance, a review of molecular studies of babesial infections in dogs in Latin America and the Caribbean revealed that prevalence varies widely according

Apêndice D- Artigo 4

Dantas-Torres et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:195
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04056-8>

Parasites & Vectors

SHORT REPORT

Open Access



Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions

Filipe Dantas-Torres^{1*} , Luciana Aguiar Figueredo¹, Kamilla Gaudêncio da Silva Sales¹, Débora Elienai de Oliveira Miranda¹, Joanna Lúcia de Almeida Alexandre¹, Yury Yzabella da Silva¹, Lidiane Gomes da Silva², Guilherme Ribeiro Valle³, Vitor Márcio Ribeiro³, Domenico Otranto^{4,5}, Katrin Deuster⁶, Matthias Pollmeier⁶ and Gertraut Altrreuther⁶

Abstract

Background: Various vector-borne pathogens (VBPs) affect dogs worldwide, with their diversity and force of infection being usually higher in the tropics. Cross-sectional studies have been conducted to investigate the prevalence of VBPs in dogs, but data from longitudinal studies are scarce. Herein, we assessed the prevalence and the year-crude incidence (YCI) of *Leishmania* spp. and other VBPs in privately-owned dogs from two geographical regions of Brazil.

Methods: A total of 823 dogs were initially screened for *Leishmania* spp. by both serology and polymerase chain reaction (PCR). From the negatives, 307 (103 from São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, and 204 from Goiana, Pernambuco) were randomly selected for the longitudinal study. These dogs were tested for various VBPs at baseline, after 8 and 12 months.

Results: Out of 823 dogs initially screened, 131 (15.9%) were positive for *Leishmania* spp. Out of the 307 dogs enrolled in the longitudinal study, 120 (39.1%) were lost for different reasons (e.g. animal death, owner decision, and lost to follow-up). In São Joaquim de Bicas, the baseline prevalence and YCI were as follows: 16.5% and 7.1% for *Anaplasma* spp.; 81.6% and 100% for *Babesia* spp.; 0% and 1.3% (only one faint positive) for *Dirofilaria immitis*; 37.9% and 22.9% for *Ehrlichia* spp.; 19.5% and 43.8% for *Leishmania* spp. In Goiana, the baseline prevalence and YCI were as follows: 45.1% and 38.3% for *Anaplasma* spp.; 79.9% and 96.0% for *Babesia* spp.; 36.3% and 39.8% for *D. immitis*; 64.7% and 58.5% for *Ehrlichia* spp.; 14.7% and 19.6% for *Leishmania* spp. Anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies were not detected in any of the samples tested herein. The prevalence and YCI of *Anaplasma* spp., *D. immitis* and *Ehrlichia* spp. were significantly higher in Goiana. In contrast, the YCI of *Leishmania* spp. infection was significantly higher in São Joaquim de Bicas.

Conclusions: We confirmed a high prevalence and YCI of various VBPs among privately-owned dogs in two geographical regions of Brazil. Our data also indicate that the risk of infection varies significantly for individual VBPs and between the regions, which may be related to several factors that are still poorly understood.

Keywords: *Anaplasma*, *Babesia*, *Dirofilaria*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, Dogs, Prevalence, Incidence

*Correspondence: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

¹ Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil

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



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Apêndice E- Artigo 5

SHORT COMMUNICATION

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 113(4): e170250, 2018 1 | 4

Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil

Maria Edileuza Felinto de Brito^{1/†}, Ericka Lima Almeida¹, Angela Cristina Rapela Medeiros², Roberto Pereira Werkhäuser¹, Joanna Lucia de Almeida Alexandre¹, Bruna Santos Lima Figueiredo Sá¹, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues¹, Sinval Pinto Brandão-Filho¹

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia, Recife, PE, Brasil

²Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Several studies have described the use of non-invasive collection methods, mostly based on the detection of parasite DNA, for diagnosis. However, no *Leishmania* specimens have been isolated from saliva. Here, we report the first isolation of *Leishmania braziliensis* from the saliva of humans with cutaneous leishmaniasis but without lesions on their mucosa. The isolates were obtained from salivary fluid inoculated in hamsters and were tested by multilocus enzyme electrophoresis. Seven samples from 43 patients suspected of having the disease were identified for *in vivo* culture. These findings suggest that saliva is a clinical sample that allows the isolation of *Leishmania* sp.

Key words: *Leishmania braziliensis* - saliva - culture media

American cutaneous leishmaniasis (ACL) has a wide spectrum of clinical signs and symptoms, and many species of *Leishmania* are implicated as etiologic agents of this disease (Weigle & Saraiva 1996). Clinical manifestations range from unapparent disease to skin lesions that may spontaneously resolve to multiple ulcerations and affected mucosa, which is associated with a high risk of disease recurrence and death (Costa et al. 2009).

Leishmania braziliensis is the primary and most prevalent pathogen associated with this disease in Brazil. This parasite is capable of producing the range of clinical manifestations, including cutaneous leishmaniasis (which may be spontaneously cured), mucosal leishmaniasis (with invasive ulcers), and disseminated cutaneous leishmaniasis (Costa et al. 2009). In a previous study, we detected 10 different kinds of zymodemes of *L. (Viannia) braziliensis*, which is the predominant species in vectors that circulate in Pernambuco, Brazil, in different clinical samples (Brito et al. 2009).

The isolation of promastigotes in culture medium allows the identification and characterisation of *Leishmania* species and therefore is of great epidemiological importance (Bensoussan et al. 2006, Rodríguez-González et al. 2006). Several studies have demonstrated non-invasive methods to collect biological samples for the diagnosis of leishmaniasis in patients suspected of having the disease (Mimore et al. 2002, Strauss-Ayali et al. 2004, Garcia et al. 2007, Figueroa et al. 2009, Boggild et al. 2011, Corvalan et al. 2011, Lombardo et al. 2012, Valencia et al. 2012). Al-

though Corvalan et al. (2011) reported the presence of *L. (V) braziliensis* DNA in the saliva of patients with skin lesions but without oral mucosa injury by polymerase chain reaction (PCR), they did manage to isolate the parasite from salivary fluid. Here, we report the first isolation of *L. (V) braziliensis* from the salivary fluid of patients with ACL.

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is considered the gold standard for identifying *Leishmania* species. It allows the identification of isolates based on phenotypic polymorphisms of enzymes (Banuls et al. 2007, Schonian et al. 2010). The aims of this study were to (a) to isolate *L. braziliensis* from the saliva of patients with ACL and with no mucosal lesions, and (b) to evaluate the use of a non-invasive collection method for parasite isolation. The findings from this study suggest that saliva allows the isolation of *Leishmania* sp.

This study was performed in two municipalities: Moreno and Abreu e Lima, both of which belong to the metropolitan region of Recife, capital of Pernambuco state, Brazil. The two municipalities have no shared borders and are about 55.7 km from one another. The areas comprise 195.603 km² and 125.99 km² of land and have population densities of 311.94 inhabitants/km² and 785.69 inhabitants/km², respectively. The predominant economic activity in these regions is the cultivation of sugarcane. The houses are built close to remnants of the Atlantic Forest, with humans and domestic animals (horses, dogs, and cats) present. *Lutzomyia whitmani* is the vector primarily responsible for transmitting *L. (V) braziliensis* in these municipalities (Brito et al. 2012).

In 2015, a total of 106 patients attending the dermatology outpatient clinic of Oswaldo Cruz Hospital, Recife, Brazil, were examined. Prior to sample collection, the participants provided informed consent using documents approved (protocol no. 038/11) by the Ethics Committee of Aggeu Magalhães Institute at the Oswaldo Cruz Foundation (AMI-PE).

doi: 10.1590/0074-02760170250

† Corresponding author: britomef@cpqam.fiocruz.br

Received 10 July 2017

Accepted 1 December 2017



online | memorias.ioc.fiocruz.br

ANEXO A- Comissão de ética no uso de animais- Certificado de Aprovação



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

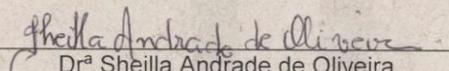
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA *leishmania sp.* DE AMOSTRAS ISOLADOS NO CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES/FIOCRUZ-PE**” protocolado sob nº **92/2015** pelo (a) pesquisador (a) Dra Maria Edileuza Felinto de Brito está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 01/12/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 01 de dezembro de 2020 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Hamster (<i>Mesocricetus Auratus</i> - raça Sírio ou Golden)	360 (Até 200 gr/ média de 4 semanas/ fêmeas)
TOTAL	360

We certify that project “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA *leishmania sp.* DE AMOSTRAS ISOLADOS NO CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES/FIOCRUZ-PE**” (CEUA Protocol nº 92/2015) coordinated by **MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on december, 01, 2016. In present version this project is licensed and valid until december 2020 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) December, 01, 2016


Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais - CEUA

Av. Professor Moraes Rebelo, 1200 - Universidade Federal de Pernambuco - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 51670-420
Tel: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

Comissão de Ética no Uso de Animais

Recife, 29 de setembro de 2017

Termo Aditivo ao Certificado de Licença N° 92/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães – CEUA/IAM, em atenção à solicitação do (a) pesquisador (a): **MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO** autoriza o presente Aditivo para licença **CEUA 92/2015** que inclui os procedimentos de retirada de hamsters do biotério, transporte, manejo no campo (caixa, mamadeira, água, cama e comida), tempo e forma de exposição, acompanhamento e retorno dos referidos animais ao Biotério NB2 desta Instituição referente ao projeto intitulado: **Caracterização molecular da *Leishmania sp.* De amostras isolados no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE.** Salientamos que este aditivo não contempla mudanças na metodologia ou outras alterações no projeto acima citado.

Ressaltamos que a data de validade desta licença continua até 01 de dezembro de 2020.

Cordialmente,

Lindomar José Pena
Coordenador da CEUA/IAM
(Fiocruz Pernambuco)

Lindomar José Pena
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Mat. Siape: 1971435
e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
IAM / FIOCRUZ