



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

**HÁBITO ALIMENTAR DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM
ÁREA DE TRANSMISSÃO INTENSA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO NORTE
DO BRASIL**

GUSTAVO COSTA FREITAS

**ARAGUAÍNA – TO
2023**

GUSTAVO COSTA FREITAS

**HÁBITO ALIMENTAR DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM
ÁREA DE TRANSMISSÃO INTENSA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO NORTE
DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a Dra. Helcileia Dias Santos

Co-orientadora: Prof^a Dra. Silvia Minharro Barbosa

**ARAGUAÍNA-TO
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

F866h Freitas, Gustavo Costa.

Hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão intensa de leishmaniose visceral no norte do Brasil. / Gustavo Costa Freitas. – Araguaína, TO, 2023.

47 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2023.

Orientador: Helcileia Dias Santos

Coorientador: Silvia Minharro Barbosa

1. mtDNA. 2. Diversidade alimentar. 3. Calazar. 4. Vetores. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GUSTAVO COSTA FREITAS

**HÁBITO ALIMENTAR DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM
ÁREA DE TRANSMISSÃO INTENSA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO NORTE
DO BRASIL**

**Hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área de
transmissão intensa de leishmaniose visceral no norte do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins – Campos Universitário de Araguaína, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Data de Aprovação: 21/12/2023

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **HELCEILEIA DIAS SANTOS**
Data: 07/03/2024 18:59:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dr^a Helcileia Dias Santos – Universidade Federal do Norte do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **BRUNA ALEXANDRINO**
Data: 07/03/2024 18:53:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dr^a Bruna Alexandrino – Universidade Federal do Norte do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA MAGALHÃES MELO**
Data: 07/03/2024 18:46:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dr^a Luciana Magalhães Melo – Universidade Estadual do Ceará

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por não me desamparar e não deixar que me faltassem forças para prosseguir e chegar até o final. Agradeço ainda a Deus por me dar a melhor família que eu poderia querer ter, por ter me dado pais (Ruy Célio e Maria das Neves) com amor, cuidado e sabedoria, o suficiente para me incentivar a sempre ir em frente e buscar a minha melhor versão e uma irmã (Thais) que é excelente no ato de cuidar e amar. Agradeço ainda pela vida do meu cônjuge (Jhon Deivide) por estar sempre comigo e que mesmo em momentos bons e ruins sempre esteve ao meu lado para me amparar, por me amar e me dar a força que eu precisava para seguir em frente.

Agradeço a Deus pela Vida da minha orientadora (Helcileia Dias) que sempre presente me assistiu em todos os momentos em que foram necessários, sempre firme e incansável, como muito difícil de se ver um exemplo de profissionalismo e ética, meu muito obrigado!

A minha coorientadora (Silvia Minharro) que sem a qual eu não teria conseguido, tamanha paciência e dedicação a mim e ao projeto, em meio a algumas dificuldades também sempre me amparou e pegou na minha mão para me ensinar do zero a vida no laboratório que aprendi a amar.

As bolsistas de iniciação científica Anna Cecília Grangeiro Rodrigues e Silva e Monyke da Silva Correia pelo processamento e identificação dos flebotômicos, por todo zelo, cuidado e comprometimento com todas as etapas que foram necessárias.

Aos colegas de trabalho do laboratório em especial aos técnicos de laboratório (Samara e Paulo) que sempre muito prestativos e que facilitam a rotina de trabalho nos laboratórios.

Aos colegas da CVU que sempre me acolhem bem, e durante os serviços sempre estavam prontos para tomar um café (Roberto Neves, Andreia, Gauchinho, Maria, Elizangela e Jonatas) vocês são demais.

A turma 6 de medicina da UFNT, da qual faço parte, e agradeço aos meus colegas por me estimularem a ser sempre melhor, e quando a gente acredita que está no fundo do poço sempre podemos contar uns com os outros.

A Secretaria Municipal de Saúde de Araguaína por meio do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araguaína-TO.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT), ao Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

por meio do Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) e a FAPT/CAPES - Programa de Desenvolvimento da Pós-graduação – Parcerias Estratégicas nos Estados pelo apoio financeiro.

Ao apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia – PROCAD/Amazônia da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/Brasil que possibilitou a difusão de tecnologias fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma antropozoonose que tem avançado em número de casos na região Norte do Brasil. Nas Américas a doença é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, que no Brasil é transmitido principalmente por fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O protozoário é adquirido pela fêmea durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado e transmitido posteriormente após reprodução no intestino do vetor. A preferência alimentar da espécie determina os hospedeiros com maior risco de infecção. Objetivou-se neste estudo investigar hábitos alimentares de *Lu. longipalpis*, utilizando métodos de diagnóstico moleculares através da amplificação de DNA mitocondrial. As fêmeas de *Lu. longipalpis* foram capturadas mensalmente durante dozes meses consecutivos utilizando armadilhas luminosas tipo CDC instaladas no intradomicílio e peridomicílio de oito bairros da zona urbana do município de Araguaína, Tocantins. As fêmeas coletadas foram dissecadas, a cabeça e terço final do abdômen seccionados e montados em líquido de Berlese para identificação. Para extração de DNA, o tórax e parte do abdômen foram utilizados para formar *pools* de até 10 fêmeas e reação em cadeia da polimerase convencional (PCRc) foi realizada utilizando primers que amplificam regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) de humano, cão, gato e galinha. Um total de 610 fêmeas foram analisadas em 61 *pools*. Frequência de positividade significativamente maior ($P < 0,05$) ocorreu para DNA de humano (47,5%) e de cão (34,40%) em relação a galinhas (13,10%) e gatos (6,50%). DNA de duas ou mais espécies animais foi encontrado em 42,6% das amostras analisadas. Os resultados indicam que populações de *Lu. longipalpis* estão presentes em regiões periféricas e central de Araguaína, o vetor visita o intradomicílio para alimentação e possui fontes alimentares variadas, com frequente alimentação em humanos e cães, advertindo para o risco de transmissão da LV quando na presença de reservatório infectado.

Palavras-chaves: mtDNA; Diversidade alimentar; Calazar; Vetores.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an anthroponosis that has increased in number of cases in the northern region of Brazil. In the Americas, the disease is caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which in Brazil is transmitted mainly by female sandflies of *Lutzomyia longipalpis*. The female acquires the protozoan during blood repast on an infected mammal and is subsequently transmitted after reproduction in the vector's intestine. The feeding preference of the species determines the hosts most at risk of infection. This study aimed to investigate the feeding habits of *Lu. longipalpis*, using molecular diagnostic methods through the amplification of mitochondrial DNA. Females of *Lu. longipalpis* were captured monthly for twelve consecutive months using CDC-type light traps installed in the intradomicile and peridomicile of eight neighborhoods in the urban area of Araguaína, Tocantins. The females collected were dissected, the head and the final third of the abdomen sectioned and mounted in Berlese liquid for identification. For DNA extraction, the thorax and part of the abdomen were used to form pools of up to 10 females, and conventional polymerase chain reaction (c-PCR) was carried out using primers that amplify regions of mitochondrial DNA (mtDNA) from human, dog, cat, and chicken. A total of 610 females were analyzed in 61 pools. A significantly higher frequency of positivity ($P < 0.05$) occurred for human (47.5%) and dog (34.40%) DNA compared to chicken (13.10%) and cat (6.50%). DNA from two or more animal species was found in 42.6% of the samples analyzed. The results indicate that populations of *Lu. longipalpis* are present in peripheral and central regions of Araguaína, the vector visits the intradomicile to feed and has varied food sources, with frequent feeding on humans, warning of the risk of VL transmission when in the presence of an infected reservoir.

Keywords: mtDNA; Food diversity; Calazar; Vectors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 1. Mapa demonstrativo dos cinco países da América do Sul que apresentaram os maiores índices de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, intervalo compreendido entre os anos de 2012 e 2022..... 14

Figura 2. Mapa demonstrativo dos dez estados brasileiros com os maiores índices de notificação de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, no intervalo do período compreendido entre os anos de 2012 e 2022..... 14

Figura 3. Mapa demonstrativo das dez cidades do estado do Tocantins com os maiores índices de notificação de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, no intervalo do período compreendido entre os anos de 2012 e 2022..... 15

Figura 4 – Espécimes de *Lutzomyia longipalpis*, macho (a) e fêmea (b), capturados em área da zona urbana de Araguaína, Tocantins..... 17

CAPÍTULO III

Quadro 1 - Primers, região do DNA, sequência e tamanho dos pares de bases dos oligonucleotídeos usados na cPCR para amplificar genes de mamíferos utilizados como fonte alimentar de flebotomíneos coletados no período de novembro de 2020 a outubro de 2021....33

Figura 1 – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, representativo dos produtos de amplificação obtidos com iniciadores Hmt2 (Humano), Dmt1 (*Canis familiaris*), Camt1 (*Felis silvestres catus*) e Chmt6 (*Gallus gallus*)..... **Erro! Indicador não definido.**5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de positividade para DNA de diferentes espécies animais em pools de *Lutzomyia longipalpis* capturadas em 8 bairros distintos do município de Araguaína-TO.....36

Tabela 2. Frequência de positividade para DNA de mais de um tipo de hospedeiro, em pools de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de 8 bairros da zona urbana do município de Araguaína, Tocantins, Brasil.....37

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 OBJETIVOS..... | 12 |
| Objetivo Geral | 12 |
| Objetivos Específicos..... | 12 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 3.1 Leishmaniose visceral no Mundo, América Latina, Brasil e no Tocantins..... | 13 |
| 3.3 Agente etiológico | 15 |
| 3.4 Flebotomíneos | 16 |
| 3.4.1 Fonte alimentar dos Flebotomíneos..... | 18 |
| 3.4.2 Investigação de hábitos alimentares dos Flebotomíneos..... | 19 |
| 3.5 Diagnóstico do repasto sanguíneo pela PCR para Flebotomíneos..... | 20 |
| 4 Referências Bibliográficas..... | 21 |
| CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DA FONTE ALIMENTAR DE FÊMEAS DE <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i> (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO INTENSA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO NORTE DO BRASIL..... | 30 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 30 |
| 2 METODOLOGIA..... | 31 |
| 2.1 Local do Estudo | 31 |
| 2.3 Identificação das Espécies..... | 32 |
| 2.4 Técnicas moleculares..... | 33 |
| 2.4.1 Extração de DNA..... | 33 |
| 2.4.2 PCR..... | 33 |
| 2.5 Análise de dados | 34 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 40 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS | 47 |

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozoonose transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae popularmente conhecidos por “mosquito palha” ou “flebotomo”, entre outras denominações. A doença era caracterizada como de zona rural, mas a partir da década de 90 se expandiu para áreas metropolitanas de grandes centros urbanos e, como consequência, o número de casos aumentou no país, atualmente o Brasil está entre os seis países do mundo com maior número de casos reportados (Opas, 2022).

No Brasil, a leishmaniose se espalhou rapidamente e não se limita apenas às áreas rurais ou pequenas cidades do interior, encontrando-se presente também nos grandes centros urbanos. A LV está distribuída em 23 estados da Federação e no distrito federal, atingindo as cinco regiões brasileiras, onde existem diferenças em relação a aspectos geográficos, climáticos e sociais (Brasil, 2013).

Os fatores climáticos e ambientais exercem influências significativas na densidade e abundância de flebotomíneos, no entanto, alguns estudos falharam em demonstrar essa correlação (Mestre *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2016), devido a provável interferência de fatores não climáticos, tais como demográficos e socioeconômicos na epidemiologia das doenças (Parham *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

O controle dos vetores no Brasil, representa um dos principais gargalos dos programas de vigilância e controle de doenças transmitidas por vetores (Sales, 2015) e para LV não é diferente. Estudo da fauna flebotomínica, as preferências alimentares de cada espécie vetora e a taxa de infecção por leishmania, ainda inexitem em algumas áreas do país, o que dificulta o entendimento da cadeia epidemiológica da doença e o direcionamento das medidas de controle (Oliveira *et al.*, 2016).

A utilização da biologia molecular para identificar as fontes alimentares dos flebotomíneos mudou a direção dos estudos sobre o comportamento alimentar dos insetos hematófagos (Pereira Filho, 2023). A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta de diagnóstico cujas perspectivas parecem boas em comparação às técnicas tradicionais, devido a sua alta sensibilidade e especificidade ao caracterizar o sangue ingerido pelas fêmeas de flebotomíneos, associado ao fato de que o DNA mitocondrial é uma região específica e não sofre mutação, dessa maneira diminui consideravelmente as chances de erros no estudo (Brito; Pereira, 2014). Ademais, conhecer o padrão alimentar dos vetores é relevante,

pois permite compreender a ecoepidemiologia destes insetos bem como características da cadeia de transmissão das leishmanioses, contribuindo para a elaboração de estratégias de prevenção e controle dessas zoonoses.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar os hábitos alimentares dos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* capturados na zona urbana do município de Araguaína – TO.

Objetivos Específicos

Investigar os hábitos alimentares dos flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* do município de Araguaína-TO, utilizando método molecular (cPCR);

Identificar as espécies de animais domésticos que fazem parte do ciclo biológico dos flebotomíneos na zona urbana do município de Araguaína – TO;

Avaliar a participação do homem como fonte alimentar de *Lu. longipalpis* em áreas da zona urbana do município de Araguaína.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico, consideradas uma das seis endemias prioritárias do mundo. São classificadas em duas formas básicas, a leishmaniose tegumentar (LT) quando acomete a pele e mucosas, e a leishmaniose visceral (LV), quando atinge órgãos internos (Fiocruz, 2013; Opas, 2021).

A LV afeta principalmente pessoas pobres, de países como a África, Ásia e América Latina, e está associada a condições como a desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico deficiente e falta de recursos financeiros. A LT está intimamente ligada a alterações ambientais, como o desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e ao processo de urbanização (Brasil, 2019; Opas, 2021).

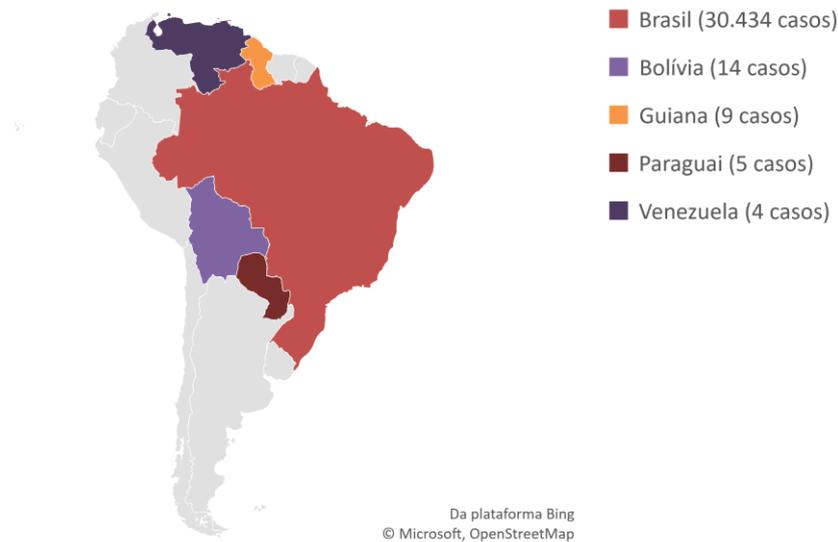
3.1 Leishmaniose visceral no Mundo, América Latina, Brasil e no Tocantins

Ocorrem de forma endêmicas em 99 países nos trópicos, subtropicais e bacia mediterrânea, sendo 89 endêmicos para LT, 80 endêmicos para LV e 71 endêmicos para as duas formas clínicas (Who, 2020, Opas, 2021).

A leishmaniose cutânea e visceral estão presente em 21 países, sendo que 19 países são endêmicos para LC e 13 países para LV. No período de 2001 a 2021, foram registrados e notificado à OPAS, um total de 1.105.545 casos de LC e Leishmaniose mucosa (LM) nas Américas, correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano. No mesmo período, foram registrados 69.665 novos casos de LV, com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 8% – considerada a mais alta quando comparada a outros continentes (Opas, 2021).

Nas Américas, a maior parte dos casos notificados está no Brasil (Figura 1), onde a incidência da doença aumentou nas últimas décadas devido ao êxodo rural, caracterizado pela massiva migração de pessoas das zonas rurais para os centros urbanos, ao aumento populacional de cães infectados cronicamente, bem como a adaptação dos flebotomíneos vetores ao habitat peridomiciliar doméstico urbano e suburbano (Harhay *et al.*, 2011; Alvar *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2018, Opas, 2021).

Figura 1. Mapa demonstrativo dos cinco países da América do Sul que apresentaram os maiores índices de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, intervalo compreendido entre os anos de 2012 e 2022



Fonte da ilustração: Arquivo do autor. Fonte de dados: Sinan, 2023.

O país possui seis estados com os maiores índices da doença, e apesar do estado do Maranhão destacar-se por apresentar o maior número de casos notificados (Figura 2), o Tocantins é o estado que registrou a maior incidência em 2022 (6,68/100.000 habitantes), seguido do Maranhão (4,23/100.000).

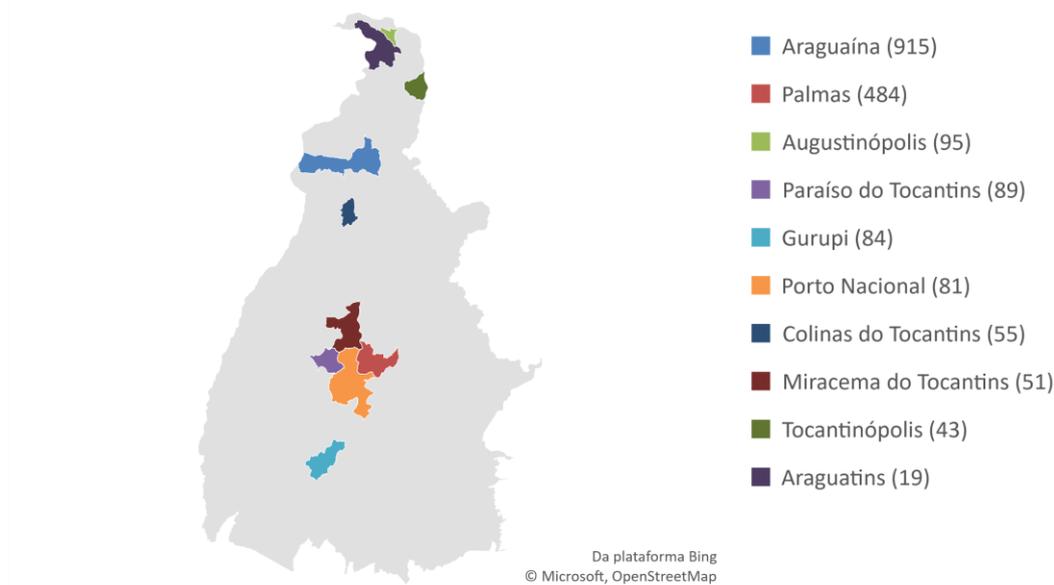
Figura 2. Mapa demonstrativo dos dez estados brasileiros com os maiores índices de notificação de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, no intervalo do período compreendido entre os anos de 2012 e 2022



Fonte da ilustração: Arquivo do autor. Fonte de dados: Sinan, 2023.

No estado do Tocantins, entre os anos de 2016 e 2022 houve um total de 1.240 casos diagnosticados (Figura 3). No entanto, grande parte dos casos está concentrada nos três primeiros anos abordados, ocorrendo uma redução gradativa da quantidade de casos confirmados nos anos de 2019 a 2022, possivelmente devido a adoção de medidas de prevenção, como exemplo o combate do inseto vetor (Silva *et al.*, 2023). Ainda assim, a estratificação do risco de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) por municípios brasileiros realizada pelo Ministério da Saúde do Brasil no período 2020-2022 classifica 10 municípios do estado do Tocantins como área de transmissão intensa, entre eles as duas maiores cidades do estado Araguaína e a capital Palmas (BRASIL, 2023).

Figura 3. Mapa demonstrativo das dez cidades do estado do Tocantins com os maiores índices de notificação de casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos, no intervalo do período compreendido entre os anos de 2012 e 2022.



Fonte da ilustração: Arquivo do autor. **Fonte de dados:** Sinan, 2023.

A cidade de Araguaína destaca-se no estado e nacionalmente, pois apresenta processo endêmico de leishmaniose visceral. Nos anos de 2007, 2008 e 2012 foi o município brasileiro que apresentou a maior incidência da doença no país (Toledo *et al.*, 2017; Nina *et al.*, 2023). Dos 2.111 casos diagnosticados no Estado entre os anos de 2012 e 2022, 25,5% (538) tiveram como município de infecção Araguaína, enquanto no município de Palmas, o segundo em número de casos, foram notificados 231 casos (10,9%) (BRASIL, 2023).

3.3 Agente etiológico

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, cujos representantes apresentam como característica uma mitocôndria única (cinetoplasto), rica em DNA mitocondrial (mtDNA) (Ferreira *et al.*, 2018). Nas Américas, a LV é ocasionada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, cujo principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Brasil, 2017; Opas, 2021). O cão, é o principal reservatório urbano, por ser considerado uma fonte de alimentação para o vetor e possuir intenso parasitismo cutâneo (Menegatti *et al.*, 2020).

A dinâmica de transmissão da doença se diferencia entre os locais de ocorrência em função das variáveis relacionadas aos parasitos, aos vetores, ao nível de susceptibilidade dos hospedeiros, aos ecossistemas e aos processos sociais de produção de uso do solo e a disponibilidade de fontes de alimentação e ocupação de novas áreas pelo homem (Araújo *et al.*, 2013).

3.4 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo conhecidos popularmente no Brasil, dependendo do estado ou da região, como mosquito palha, asa dura, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrepiado (Brasil, 2014).

Anatomicamente os flebotomíneos são marcados por terem cerdas abundantes em seu corpo, o que os distingue dos outros dípteros. Seu ciclo de vida é completo, ou seja, são holometabólicos, passam pelo estágio larval com quatro estágios evolutivos (L1, L2, L3 e L4), durante fase de pupa seu desenvolvimento ocorre em matéria orgânica e chegam à fase adulta alada com dimorfismo sexual (Silva *et al.*, 2017).

As formas imaturas de flebotomíneos se desenvolvem no solo, locais ricos em matéria orgânica em decomposição, onde a visualização das larvas em ambientes naturais é rara, pois nesse estágio elas têm grande mobilidade e se deslocam à procura de alimento, e ao emergirem de pupa para a fase adulta, podem utilizar uma infinidade de ecótopos como abrigo (Tonelli *et al.*, 2017).

Quando adultos apresentam dimorfismo sexual, cujas diferenças morfológicas mais observadas estão nos últimos segmentos abdominais modificados que constituem a genitália (Figura 4) e na cabeça, na qual a probóscide é mais desenvolvida nas fêmeas para sugar o sangue e estas possuem dentes no cibário, que são adaptados para iniciar a digestão sanguínea de forma mecânica. Os adultos se abrigam em lugares úmidos e com sombra até necessitarem realizar

repasto sanguíneo e cópula, que se configura como momento ideal para invadir áreas antropizadas (Tonelli *et al.*, 2017).

Figura 4 – Espécimes de *Lutzomyia longipalpis*, macho (a) e fêmea (b), capturados em área da zona urbana de Araguaína, Tocantins.



Fonte: Laboratório de Parasitologia, UFNT, 2023.

Esses insetos são de ambientes silvestres, com hábito crepuscular e noturno. Durante o dia, permanecem em locais protegidos, abrigam-se nas copas ou nas bases de árvores ocas, troncos apodrecidos ou raízes tubulares, no chão entre as folhas secas caídas, dentro de cavernas, em frestas de rochas, dentro de tocas de animais, entre outros locais que oferecem proteção (Casanova *et al.*, 2013; Dutra-Rego *et al.*, 2022). No entanto, as mudanças ambientais provocadas por fenômenos naturais ou pela intervenção humana, como a destruição da vegetação nativa, a ocupação humana desordenada e invasão de áreas florestais têm alterado os habitats naturais dos flebotomíneos (Valderrama *et al.*, 2011).

Estudos em áreas antropizadas, mostram a presença dos flebotomíneos em abrigos de animais domésticos, como em galinheiro, chiqueiro, estábulo, curral e sob material acumulado nos quintais das habitações. Em ambiente peridomiciliar, são encontrados nas paredes internas e externas das residências (Santini *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017).

Os flebotomíneos representam um grupo de aproximadamente 1000 espécies conhecidas em todo o mundo, das quais 530 foram encontradas nas Américas. Estima-se que 98 espécies são possíveis vetores naturais de *Leishmania* spp. (Shimabukuro *et al.*, 2017). No Brasil, foram identificadas cerca de 230 espécies, das quais *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermedia* e *Migonemyia migonei*, são atribuídas como vetores de espécies de *Leishmania* que

causam a forma cutânea ou tegumentar e *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* importantes vetores da espécie de *Leishmania* que causa a forma visceral (Missawana *et al.*, 2011).

O início do ciclo dessa enfermidade começa quando a fêmea do flebotomíneo se alimenta em um animal infectado e ingere a forma amastigota do protozoário presente na circulação periférica, em seguida há a transformação em promastigota no intestino do vetor que migra para a probóscide e podem ser eliminados em um hospedeiro suscetível. Quando na forma promastigota são fagocitados por macrófagos e se transformam em amastigotas, nessa fase eles se multiplicam e causam o rompimento do macrófago, sendo fagocitados por novos macrófagos e infectando vários tecidos (Rocha *et al.*, 2021).

A duração do ciclo de infecção no invertebrado é em torno de seis a nove dias, e varia de acordo com a espécie envolvida. O ciclo se completa, com o desenvolvimento de formas metacíclicas infectantes que são altamente ativas e migram ao longo do intestino anterior, podendo ser liberadas em um novo repasto sanguíneo (Aguiar; Rodrigues, 2017).

Uma infecção bem-sucedida depende da amplificação do parasito e é impulsionada pela ingestão de várias refeições sanguíneas pelo flebotomíneo, quando o número de parasitos é muito baixo inicialmente, a realização de novo repasto sanguíneo aumentará a replicação de leptomonas, e eleva o número de parasitos, de modo que favorece a diferenciação em formas metacíclicas (Elnaiem, Ward e Young, 1994). A efetivação de terceiro repasto sanguíneo e outro ciclo de replicação do parasito pode ser necessária, a depender do inóculo inicial (Serafim *et al.*, 2018). O período de incubação é dependente da espécie acometida e o tipo de leishmaniose, mas normalmente possui uma variação de 10 dias a 7 meses (Brasil, 2017).

3.4.1 Fonte alimentar dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos possuem mandíbulas atrofiadas e probóscide curta, especializada em obter carboidratos em fontes naturais tais como: néctar, excreções de afídeos, seiva vegetal e frutas maduras. No entanto, as fêmeas mudam sua alimentação, trocando fontes naturais por sangue de animais vertebrados, para fins reprodutivos (Kamhawi, 2000; Ready, 1979).

A espécie *Lu. longipalpis* é uma espécie que tem como característica possuir diferentes fontes alimentares, sendo assim, humanos, cães, gatos, aves e outros animais podem ser alvos de repastos sanguíneos (Soares *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2021). Esse comportamento facilita a transmissão de doenças. Além disso, a diversidade vegetal, animal e fatores microclimáticos que caracterizam as florestas tropicais fornecem recursos alimentícios, abrigos e condições

ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento dos flebotomíneos, influenciando a abundância e diversidade de espécies (Killick-Kendrick, 1999; Silva *et al.*, 2007).

3.4.2 Investigação de hábitos alimentares dos Flebotomíneos

Para avaliar os hábitos alimentares de flebotomíneos, a principal ferramenta é a busca por vestígios de sangue no tubo digestivo do vetor que identifiquem os animais que são usados como fonte alimentar dos insetos, assim como para identificar potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. e analisar a presença do parasito. Como forma de estudo da fonte alimentar podem ser utilizadas ferramentas, tais como: teste de aglutinação em látex (Boorman *et al.*, 1977), ensaios de antígeno-anticorpo com a precipitina (Nery *et al.*, 2004, Afonso *et al.*, 2005), o teste imunoenzimático (ELISA) (Agrela *et al.*, 2002, Bongiorno *et al.*, 2003; Marassá *et al.*, 2006, Rossi *et al.*, 2008; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009; Svobodová *et al.*, 2003), além de difusão em gel de agarose (Srinivasan; Panicker, 1992; Guzman *et al.*, 1994). Ensaios com precipitina tornaram-se ultrapassados devido à necessidade de uso de sangue fresco, possuir baixa sensibilidade e haver possibilidade de reação cruzada (Marassá *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2021).

O teste de reação em cadeia da Polimerase (PCR) é o mais adequado para realizar a análise do conteúdo estomacal das fêmeas, pois permite identificar e ampliar quantidade suficiente de DNA de uma sequência de interesse, com maior especificidade e sensibilidade (Alves; Bevilacqua, 2004).

A identificação da fonte alimentar em flebotomíneos é realizada a partir da captura de fêmeas em ambiente natural e processamento dos segmentos finais do abdômen e da cabeça para identificação e posterior processamento individual ou em *pools* do restante do abdômen (Anaguano *et al.*, 2015; Ávila *et al.*, 2018). A análise de *pools* com 10 a 20 fêmeas garante maior quantidade de material a ser analisado, facilitando a visualização dos resultados dos testes empregados, que pode não ser suficiente quando realizadas análise individuais (Soares *et al.*, 2014).

O conhecimento da preferência alimentar dos flebotomíneos permite o emprego de medidas mais adequadas e eficazes para seu controle. Dessa forma, estudos sobre a biologia e o comportamento de flebotomíneos, são importantes não apenas para um melhor entendimento da história natural da doença (Forattini, 1973; Dias-Sversutti *et al.*, 2007), mas também apresentam grande relevância nas investigações da relação hospedeiro-vetor e conseqüentemente na ecoepidemiologia das leishmanioses (Roque; Jansen, 2014). Conhecendo os hábitos alimentares dos flebotomíneos pode-se ter indícios dos possíveis reservatórios que

estariam atuando na manutenção do ciclo enzoótico, além de melhor avaliar o grau de antropofilia da espécie (Nery *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2012).

3.5 Diagnóstico do repasto sanguíneo pela PCR para Flebotomíneos

Os primeiros registros da utilização da biologia molecular como forma de investigação da fonte alimentar de insetos surgiram a partir da primeira década do século XXI (Ngo; Kramer, 2003; Kent; Norris, 2005). A partir daí as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos por PCR para detecção de DNA e suas variações foram investigadas e testadas para identificação de fonte alimentar (Soares *et al.*, 2014; Tanure *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017).

A evolução da técnica de PCR e o advento da PCR quantitativa ou em tempo real (qPCR), entre outras variantes, possibilitou uma ferramenta valiosa na detecção, quantificação e tipagem de alvos de DNA (Kaltenboeck; Wang, 2005; Quaresma *et al.*, 2009).

Para a realização da PCR é fundamental que o DNA esteja muito bem purificado, livre de organelas celulares que possam comprometer o resultado, tanto para análise diagnóstica quanto para genotipagem (Watson; Berry, 2005).

A extração de DNA pode ser realizada por métodos que variam tanto nos seus princípios norteadores, como no rendimento, tempo de execução, relação custo / benefício e na qualidade dos ácidos nucleicos obtidos. Este processo possui basicamente duas etapas: a lise celular e a purificação do DNA (Watson; Berry, 2005).

Entre os alvos escolhidos para identificação de fontes alimentares por PCR estão os genes de cópia única PNOG (prepronociceptin gene) e o citocromo b (cyt b) mitocondrial, que são utilizados em estudos filogenéticos, em diferentes espécies de mamíferos, tornando-se bons alvos para o estudo da origem do conteúdo alimentar de insetos hematófagos (Heouas *et al.*, 2007). No entanto, o ensaio depende de uma série de fatores como a escolha dos reagentes e equipamentos específicos para que a reação ocorra de forma adequada, tais como o termociclador, material biológico, primers, dNTPs, MgCl₂, tampão e Taq polymerase (Novais; Pires-Alves, 2004; Agne *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2014).

O cyt b já foi utilizado em muitos estudos para detecção de hábitos alimentares de vários vetores (Kent; Norris, 2005; Moloei *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2017). Entre as vantagens deste marcador, está sua localização no genoma mitocondrial (que não sofre recombinação) e a disponibilidade de sequências completas no GenBank, permitindo uma comparação extensa entre as espécies (Perkins; Schall, 2002).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. Identification of Blood Meals Imbided by Phlebotomine Sand Flies Using Cytochrome *b* PCR and Reverse Line Blotting. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. Jerusalem, Israel. Volume 9, Number 1, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1089/vbz.2008.0064>

AFONSO, M. M.S.; GOMES, A.C.; MENESES, C.R.V.; RANGEL, E.F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (N.) *intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1816–1820, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000600030>.

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C.; CARANHA, L.; RANGEL, E.F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (L.) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal Tropical Medicine**, 2012. DOI: 10.1155/2012/858657.

AGNE, M.A.V.; GUIMARÃES, R.L.; BRANDÃO, L.A.C.; SOUZA, P.R.E.; CARVALHO, A.A.T.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A REVIEW. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.1–11, 2009. DOI: 10.1590/S1517-83822009000100001.

AGRELA, I.; SANCHEZ, E.; GOMEZ, B.; FELICIANGELI, M. D. Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, Maracay-Edo, vol. 39, n. 3, p. 440–445. 2002. DOI: <10.1603/0022-2585-39.3.440>.

AGUIAR, P.F.; RODRIGUES, R.K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017. ISSN 2236-5257.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, p.259-265, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>.

ANAGUANO, D. F *et al.* Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. **Acta Tropica**, Quito, vol. 152, p.116–120, 2015. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.004>>.

ARAÚJO, V.E.M *et al.* Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p.2540, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002540>.

BONGIORNO, G.; HABLUETZEL, A.; KHOURY, C.; MAROLI, M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta Tropica**, Roma, vol. 88, n. 2, p. 109 – 116, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00190-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00190-6).

BOORMAN, J.; MELLOR, P.S.; BOREHAM, P. F. L.; HEWETT, R. S. A latex agglutination test for the identification of blood-meals of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v.67 , n. 2 , p. 305-311, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485300011123>.

BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de desenvolvimento da Epidemiologia em serviços. **Guia de Vigilância em saúde: volume único**. Brasília - DF, 3ª Ed, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília – DF, 1ª Ed, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Brasília -DF: Ministério da Saúde, 4ª Ed, 725 p., 2019.

BURKOT, T.R; GOODMAN, W.G; DEFOLIART, G.R. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.1336–41, 1981. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.1336>.

CASANOVA, C. Larval Breeding Sites of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7(9), p.2443, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002443>.

DE ÁVILA, M. M *et al.* Ecology, feeding and natural infection by Leishmania spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**, Rio Branco, vol. 11, n. 64, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y>.

DE ÁVILA, M.M *et al.* Ecology, feeding and natural infection by Leishmania spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**, Rio Branco, vol. 11, n. 64, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y>.

DIAS-SVERSUTTI, A.; SCODRO, R.; REINHOLD-CASTRO, K.; NEITZKE, H.; TEODORO, U. Estudo preliminar de preferência alimentar de Nyssomyia neivai (Pinto) e Nyssomyia whitmani (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 36, p.953-59, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000600019>.

DUTRA-REGO, F.; FREIRE, M.L.; CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE FILHO, J. D. Revisiting the cave-dwelling sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazil: Diversity and potential role in the transmission of Leishmania Ross, 1903 (Kinetoplastida:

Trypanosomatidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p.1-16, 2022. DOI: 10.1111/mve.12578.

FERREIRA, T.S et al. High molecular prevalence of Leishmania in phlebotomine sand flies fed on chicken blood in Brazil. **Veterinary and Parasitology**, v.15, p.259:80-84, 2018. Doi: 10.1016/j.vetpar.2018.07.004. Epub 2018 Jul 7. PMID: 30056989.

FIOCRUZ. **Leishmaniose**. 2013 Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br/leishmaniose>
Acesso em: 08/10/2023.

FONTELES, R.S *et al.* Preferência alimentar sanguínea de Lutzomyia whitmani (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 647–650, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000600007>.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. São Paulo, E. Blucher/EDUSP Ed. 658 p, 1973.
HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitologia**, v.27, p.403-9, 2011. DOI: 10.1016/j.pt.2011.04.001.

HEOUAS, N.; PESSON, B.; BOUDABOUS, R.; DEDET, J.P.; BABBA, H.; RAVEL, .
Development of molecular tool for the identification of Leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, p.1054-9, 2007. DOI:10.4269/ajtmh.2007.77.1054.

KALTENBOECK, B.; WANG, C.M. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. **Advances in Clinical Chemistry**, New York, v.40(4), p.219-259, 2005. DOI: 10.1016/s0065-2423(05)40006-2.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections. **Microbes Infectology** v.2, p.1765–73, 2000. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01331-9.

KENT, R. J.; NORRIS, D. E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Maryland, vol. 73, n. 2, p. 336–342, 2005.
PMID: 16103600.

KENT, R.; NORRIS, D. Identification os mammalian blood meal in mosquitos by a multiplex polymerase chain reaction targeting cytochrome B. **American Journal medicine and Hygiene**, v.73, p.336-42, 2005. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.336>.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology, Philadelphia**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999. DOI: 10.1016/s0738-081x(99)00046-2.

MACHADO, T.D.O *et al.* The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential Leishmania spp. vectors in Brazilian savanna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170126>.

MALEKI-RAVASAN, N.; OSHAGHI, M.A.; JAVADIAN, E.; RASSI, Y.; SADRAEI, J.; MOHTARAMI, F. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. **Iran J Arthropod Borne Dis.** 2009;3(1):8-18. Epub 2009 Jun 30. PMID: 22808367; PMCID: PMC3385529.

MARASSÁ, A. M *et al.* Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 183–186, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000200010>.

MARASSÁ, A.M *et al.* Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2004; 37(6): 441-446. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000600003>.

MENEGATTI, J.A *et al.* Fauna flebotomínica e soroprevalência para leishmaniose visceral canina em área urbana na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11549>.

MESTRE, G.L.C *et al.* Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.20, p.228-234, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300010>.

MISSAWA, N.A *et al.* Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p.76-78, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100017>.

MOLOEI, G.; ANDREADIS, T.G.; ARMSTRONG, P.M.; DIUK-WASSER, M. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora* and *Uronotaenia*. **Journal of Medical Entomology**, v.45(6), p.1143-51, 2008. DOI:10.1603/0022-2585(2008)45.

NERY, L.C.R.; LOROSA, E. S. FRANCO, A.M.R. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.571-4, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600006>.

NGO, K.A.; KRAMER, L.D. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. **Journal of medical entomology**, vol. 40, n. 2, p. 215-22, 2003. DOI:<10.1603/0022-2585-40.2.215>.

NINA, L. N. S *et al.* Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, São Luís, vol. 47, n. 160, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.160>>.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ed.33, p.11, 2004.

OLIVEIRA, E.F *et al.* Monthly distribution of phlebotomine sand flies, and biotic and abiotic factors related to their abundance, in an urban area to which visceral leishmaniasis is endemic in Corumbá, Brazil. **PloS One**, v.11, p.1651-55, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165155>.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. Washington, D.C: OPAS, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Número 9, dezembro de 2020. Washington, DC: OPAS; 2020. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>> . Acesso em: 06/08/2023.

PARHAM, P.E *et al.* Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science**, v.370, p.1665, 2015. DOI: 10.1098/rstb.2013.0551.

PEREIRA FILHO, A.A. Flebotomíneos - importância, diversidade e sua importância na transmissão das Leishmanioses. As ciências biológicas e os progressos que beneficiam a sociedade. Cap. 3. 105 p. 2023. ISBN: 978-65-258-1821-4. DOI: 10.22533/at.ed.214230410.

PERKINS, S.L.; SCHALL, J.J.A. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal Parasitology**, v.88, p.972-8, 2002. DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[0972:AMPOMP]2.0.CO;2.

QUARESMA, P *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by realtime PCR. **Acta Tropica**, v.111, p.289-94, 2009. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.05.008

QUARESMA, P.F.; CARVALHO, G.M.L.; RAMOS, M.C.N. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 480–485, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400007>.

READY, P.D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal Medicine Entomology**, v.16, p.413–23, 1979. DOI: 10.1093/jmedent/16.5.413.

ROCHA, A.M.S. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Município de Ouro Preto Minas Gerais Brasil. **In: Anais do 11º Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2021, Fortaleza. Anais eletrônicos**. Disponível em: <<https://proceedings.science/epi-2021/trabalhos/aspectos-epidemiologicos-da-leishmaniose-visceral-canina-em-ouro-preto-minas-ger?lang=pt-br>>.

RODRIGUES, A.C.M *et al.* A new whole mitochondrial genome qPCR (WMG-qPCR) with SYBR Green® to identify phlebotomine sand fly blood meals. **Veterinary Parasitology**, Fortaleza, vol. 238, p. 17–23, 2017. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.007>>.

ROQUE, R.L.A.; JANSEN, M.A.; Hospedeiros e Reservatórios de *Leishmania* spp. E sua importância na Manutenção dos Ciclos de Transmissão nos Ambientes Silvestres e Sinantrópico. In: SILVA, F. et. Al. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fio Cruz, p. 233-257, 2014. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0015>.

ROSSI, E *et al.* Fenologia sazonal, preferências de alimentação sanguínea do hospedeiro e infecção natural por *Leishmania* de *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) em um foco altamente endêmico da leishmaniose canina na província de Roma, Itália. **Acta Trop.**; 105 :158–165, 2008.

SALES, K. G. DA S. **PCR em tempo real para caracterização de fontes alimentares de flebotomíneos (diptera: psychodidae)**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 68f. 2015. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CRUZ_1a8e9e1fe6f5e31aab97ae19085db90d.

SANTINI, M.S *et al.* Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. **Medicina Veterinária e Entomologia**, v. 32, p. 197-205, nov. 2017. DOI: <<https://doi.org/10.1111/mve.12283>>.

SANTOS, E.A.; STERNBERG, C.; ALMEIDA, R.T. Influência da temperatura ambiente na análise do termociclador. In **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**. n.[s/n], p.1522-1525, 2014. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.peb.ufrj.br/images/Tese0318_2019_04_10.pdf.

SANTOS, H.D *et al.* High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins. **Brazilian Ciencia Rural**. Araguaína, v. 47, n° 3, p. 3–8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160260>.

SHIMABUKURO, P.H.F.; ANDRADE, A.J.; GALATI, E.A.B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **Zookeys**, v. 660, p. 67-106, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5549530/>.

SILVA, A.O. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania* (Viannia) spp.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 77p, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/23758>.

SILVA, A.S.G.; SILVA, S.O.; SILVA, R.C.R.; PINHEIRO, V.C.S.; REBÊLO, J.M.M.; MELO, M.N. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, p. 1-19, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179052>.

SILVA, D. F.; FREITAS, R. A; FRANCO, A.M.R. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de

Manacapuru, AM. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 138-144, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000100017>.

SILVA, E.P *et al.* Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral humana no Tocantins entre os anos de 2016-2022. **Ciências da Saúde**, ed.127, 2023. DOI: 10.5281/zenodo.10049160.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. Leishmaniose Visceral - Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 20 nov. 2023.

SOARES, V.Y.R *et al.* Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz**, Rio de Janeiro, vol. 1, n. 09, p. 379-383, 2014. DOI: <10.1590/0074-0276130405>.

SOUSA, R.L.T *et al.* Padrões de fonte alimentar dos flebotomíneos (diptera: psychodidae) vetores das leishmanioses: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.13, p.8567, 2021. DOI: <https://doi.org/10.25248/REAS.e8567>.

SRINIVASAN, R.; PANICKER, K. N. Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. **The southeast asian journal of tropical medicine and public health**, Puducherry - India, Vol. 23, n. 3, p. 486-488, 1992. PMID: 1488704, disponível em: <https://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/1992-23-3/1992-23-3-486.pdf>, acessado em: 13 de dezembro de 2023.

SVOBODOVÁ, M.; SÁDLOVÁ, J.; CHANG, K. P.; VOLF, P. Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Turkey, vol. 68, n. 1, p. 6-9, 2003. PMID: 12556140.

TANURE, A.; PEIXOTO, J.C.; AFONSO, M.M.S. Identification of sandflies (diptera: psychodidae: phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 321-324, 2015. DOI: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400008>>.

TOLEDO, C.R.S.; ALMEIDA, A.S.; CHAVES, S.A.M.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; CALDAS, J.P. Vulnerability to the transmission of human visceral leishmaniasis in a Brazilian urban area. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 51, n. 49, 2017. DOI: <<https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006532>>.

TONELLI, G.B *et al.* Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178628>.

VALDERRAMA, A. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.1024-31, 2011. DOI: 10.1590/s0074-02762011000800021.

WATSON, J. D.; BERRY, A. **DNA: o segredo da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1; Acesso em 20 de novembro de 2023.

CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DA FONTE ALIMENTAR DE FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO INTENSA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO NORTE DO BRASIL

RESUMO

A picada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) infectada é a principal forma de transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. Estes insetos são hematófagos e o conhecimento da fonte alimentar é uma ferramenta importante para a compreensão da cadeia epidemiológica da doença em uma região. Objetivou-se neste estudo investigar os hábitos alimentares de fêmeas de *Lu. longipalpis*, provenientes de populações de flebotomíneos da zona urbana do município de Araguaína, Tocantins, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os flebotomíneos foram capturados, ao longo de um ano, em armadilhas luminosas tipo CDC instaladas mensalmente, durante três dias consecutivos, no intradomicílio e peridomicílio de residências localizadas em oito bairros da cidade. Para investigação do hábito alimentar as fêmeas capturadas foram identificadas e analisadas em *pools* de até 10 fêmeas, utilizando-se iniciadores que amplificam regiões do DNA mitocondrial do ser humano, cão, gato e galinha. Foram analisados 61 *pools* e em todos alguma fonte alimentar foi identificada. As maiores frequências observadas foram para DNA de humanos (29 *pools*; 47,5%) e de cão (21 *pools*; 34,4%), que diferiram significativamente da frequência observada para DNA de galinha (8 *pools*; 13,1%) e gato (4 *pools*; 6,5%), porém não diferiram entre si. Refeições mistas de sangue foram encontradas em 26 *pools* (42,6%) analisados, com maior frequência de DNA de humano e cão (18,0%). Os resultados demonstram que populações de *Lu. longipalpis* na zona urbana de Araguaína possuem hábitos antropofílicos e zoofílicos, podendo alimentar-se em humanos, cães, gatos e galinhas.

Palavras-chaves: Biologia molecular. Hábitos alimentares. Reservatório. Primers.

ABSTRACT

The bite of female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) is the main form of transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. These insects are hematophagous, and knowledge of the food source is an important tool for understanding the epidemiological chain of the disease in a region. This study aimed to investigate the eating habits of females of *Lu. longipalpis*, from sandfly populations in the urban area of the municipality of Araguaína, Tocantins, using polymerase chain reaction (PCR). The sandflies were captured in CDC-type light traps installed monthly, for three consecutive days in the intra-domestic and peridomicile areas of residences located in eight city neighborhoods. To investigate feeding habits, captured females were identified and analyzed in pools of up to 10 females, using primers that amplify regions of mitochondrial DNA from humans, dogs, cats, and chickens. 61 pools were analyzed and in 61 some food source was identified. The highest frequencies observed were for human DNA (29 pools; 47.5%) and dog DNA (21 pools; 34.4%), which differed significantly from the frequency observed for chicken DNA (8 pools; 13.1%) and cat (4 pools; 6.5%), but they did not differ from each other. Mixed blood meals were found in 26 (42.6%) analyzed pools, with

a higher frequency of human and dog DNA (18.0%). The results demonstrate that populations of *Lu. longipalpis* in the urban area of Araguaína have anthrophilic and zoophilic habits and can feed on humans, dogs, cats, and chickens.

Keywords: Molecular biology. Feeding habits. Reservoir. Primers.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença de transmissão vetorial, causada nas Américas pelo protozoário *Leishmania infantum* (Lima *et al.*, 2020). A doença afeta principalmente crianças, idosos e imunocomprometidos e é letal se não tratada (Opas, 2023). No Brasil, a partir da década de 20 a doença passou a ser registrada com elevada incidência em grandes centros urbanos, o que foi atribuído a migração de pessoas da zona rural e ocupação da periferia de centros urbanos (Jogas Junior, 2023).

Dentre os países da América do Sul o Brasil se destaca por responder por mais de 90% dos casos de LV notificados (Opas, 2022). O Tocantins é um estado que está situado na região norte do Brasil, localizado na mesorregião ocidental do estado (Rodrigues *et al.*, 2023), em uma área de transição entre o Cerrado e a Floresta Amazônica (Alencar *et al.*, 2019) considerado região endêmica para LV, configurando entre os 10 estados brasileiros com maior incidência média de LV (Reis *et al.*, 2019). No período de 2007 a 2015 foi classificado pelo ministério da saúde do Brasil como área de transmissão muito intensa de LV, passando a transmissão intensa em 2016 (Nina *et al.*, 2023).

A principal forma de transmissão da LV é a picada de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, no Brasil especialmente as espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Migonemyia migonei*, sendo a primeira com ampla distribuição no território brasileiro (Silva *et al.*, 2023).

A hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas de flebotomíneos, uma vez que precisam de sangue para a maturação dos ovos. Durante o repasto sanguíneo podem adquirir formas amastigotas de *Leishmania* em hospedeiros infectados e posteriormente transmitir promastigotas metacíclicos em repastos seguintes a hospedeiros susceptíveis (Conceição-Silva e Alves, 2014). Estes insetos são antropofílicos, porém diversas espécies animais já foram identificadas como fonte alimentar, entre elas o cão, gato, roedores, aves (De Sousa *et al.*, 2021), demonstrando uma preferência alimentar eclética, o que justifica sua presença em locais onde vivem galináceos, suínos, caprinos e equinos (Baum *et al.*, 2013)

A identificação da fonte alimentar de flebotomíneos tem importante significado ecológico e epidemiológico, pois indica possíveis locais, como criadouros animais favoráveis ao desenvolvimento do vetor e potenciais reservatórios da doença, além de subsidiar investigações sobre o papel dos animais como fator de risco ou fator protetor para a infecção no homem, dessa maneira, norteadando as atividades de controle e vigilância sanitária (Oliveira-Pereira *et al.*, 2008).

Métodos como testes de precipitina, inibição de hemaglutinação, ensaio imunoenzimático foram utilizados para identificação da fonte alimentar de flebotomíneos (Ogusuku *et al.*, 1994; Boreham, 1975; Svobodova *et al.*, 2003), porém a necessidade de produzir anticorpos específicos contra cada potencial hospedeiro e uso de sangue relativamente fresco limitam o uso destes métodos. Os métodos moleculares baseado na amplificação de DNA nuclear ou mitocondrial de diferentes hospedeiros por PCR (reação em cadeia da polimerase) simplificaram e melhoraram a sensibilidade na identificação do repasto sanguíneo (Mukabana *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2013).

Este estudo objetivou investigar os hábitos alimentares de *Lu. longipalpis* provenientes da zona urbana de Araguaína-TO, utilizando a PCR convencional como ferramenta diagnóstica, visando contribuir para o conhecimento da diversidade alimentar dos vetores da leishmaniose visceral na região.

2 METODOLOGIA

2.1 Local do Estudo

O estudo foi conduzido em pontos da zona urbana do município de Araguaína, Tocantins, região Norte do Brasil. A sede do município está a 227m de altitude e situa-se nas coordenadas de 07° 11' 28" de latitude Sul e 48° 12' 26" de longitude Oeste (Figura 1). O clima é tropical úmido, com temperaturas médias máxima de 32°C e mínima de 20°C. A estação chuvosa ocorre entre os meses de novembro e maio e o período de seca de junho a outubro. A precipitação anual é acima de 1.700 milímetros (Araguaína; Pmae, 2013). A vegetação da região apresenta ambos os biomas, do cerrado e da floresta amazônica (Reis *et al.*, 2019).

Os pontos de coleta foram selecionados por conveniência em oito bairros representativos das regiões norte (Universitário e Parque Bom Viver), nordeste (Presidente Lula), sul (Lago Sul e Xixebal), leste (Alto Bonito), oeste (São Pedro) e Central da zona urbana do município, selecionados considerando a ocorrência prévia de casos de Leishmaniose

visceral humana (LVH) e a presença de cão no domicílio, sendo selecionadas oito residências, uma em cada bairro que foram feitas as coletas ao longo do período.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFT sob número de parecer CEP/UFT 4.214.357.

2.2 Captura de Flebotomíneos

As fêmeas de flebotomíneos foram capturadas por meio da instalação de armadilhas luminosas tipo CDC (Center of Diseases Control) posicionadas a aproximadamente 1,5m de altura (Figura 2) no intradomicílio e peridomicílio de residências localizadas em cada um dos oito bairros selecionados. Cada domicílio foi identificado como ponto de coleta e incluído no estudo após consentimento do responsável, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para captura as armadilhas eram ligadas diariamente, durante três dias consecutivos, as 18h00 e retiradas a partir das 06h00, permanecendo ligadas por no mínimo 12 horas contínuas. No dia posterior a instalação, os copos coletores presentes nas armadilhas eram recolhidos e encaminhados ao Laboratório de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína para triagem dos flebotomíneos. As fêmeas capturadas em cada ponto foram acondicionadas separadamente em tubos Falcon, armazenadas a seco e mantidas congeladas a 20°C negativos e encaminhadas para identificação e realização dos testes moleculares.

As capturas foram realizadas mensalmente em cada ponto, durante 12 meses consecutivos, no período de novembro de 2020 a outubro de 2021, totalizando 72 armadilhas por residência e 576 no total do experimento. As mesmas residências foram utilizadas como ponto de coleta ao longo da pesquisa.

2.3 Identificação das Espécies

Cada fêmea capturada foi submetida a um processo de dissecação em uma gota da solução tampão fosfato pH 7,0. O corpo foi separado em três partes, onde a cabeça e os três últimos segmentos abdominais foram montados entre lâminas e lamínulas em meio Hoyer's e após clarificação as espécies foram identificadas por meio de observação de características morfológicas em microscopia óptica e chaves taxonômicas (Young e Ducan, 1994; Galati, 2003). O tórax e o restante do abdômen foram colocados individualmente em microtubos e estocados a -20°C para análises moleculares.

2.4 Técnicas moleculares

2.4.1 Extração de DNA

Foram capturados e identificados 3380 espécimes de *Lu. longipalpis* nas 8 localidades pesquisadas. As fêmeas representaram 22,8% (771) dos espécimes capturados e a maior proporção de fêmeas foi obtida no peridomicílio (55,8%). Foram analisados conteúdos intestinais de 610 fêmeas, totalizando 61 pools.

Para extração de DNA, foram formados *pools* de até 10 fêmeas por ponto pesquisado. Em pontos onde o número de fêmeas não atingiu a quantidade determinada, as amostras foram formadas pelo número total de fêmeas capturadas.

O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (k182001 - Invitrogen®), com protocolo ajustado para a extração do DNA de flebotomíneos, onde cada *pool* de fêmeas foi macerado em 180uL de tampão de digestão genômica e 20 uL de proteinase K e mantido em processo de digestão por 4 horas.

2.4.2 PCR

O DNA extraído foi submetido à PCR convencional (cPCR) para amplificação de DNA mitocondrial utilizando os primers apresentados no quadro 1. Para controle da reação, foram utilizadas amostras de DNA de cão (*Canis lupus familiaris*), gato (*Felis catus*), galinha (*Gallus gallus*) e humano (*Homo sapiens*), e para controle negativo foi utilizado água Milli-Q®.

Quadro 1 - Primers, região do DNA, sequência e tamanho dos pares de bases dos oligonucleotídeos usados na cPCR para amplificar genes de mamíferos utilizados como fonte alimentar de flebotomíneos coletados no período de novembro de 2020 a outubro de 2021

| Espécie | Descrição dos Primers | Tamanho dos PB |
|--------------------------------------|--|----------------|
| <i>Homo sapiens</i> (Hmt2) | primer F AAT CAT ACA AAG CCC CCG CA primer R TGG GGT TAG CGA TGG AGG TA | 162 pb |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (Dmt1) | primer F CAC ACC CAC TAC CAT CCC AC primer R TGA GGC GGT GCA TAA TGG TT | 193 pb |
| <i>Felis catus</i> (Camt1) | primer F TGT GGC TCA AAC CAT AGT TTC primer R TGT GGC ATG TCA TTA AGG GGA G | 167 pb |
| <i>Gallus gallus</i> (Chmt6) | primer F CCC AAG CCC ATG ACC AAT CT primer R TGG AAG GTG CTT TCT CGG AC | 168 pb |

Fonte: Rodrigues *et al.*, 2017

As reações tiveram volume total de 25µL contendo 21,4 µL de mastermix (Invitrogen), 0,3 µL de primer forward (20 pmol), 0,3 µL de primer reverse (20 pmol) e 3µL de DNA (20 a 50mmol). As amplificações foram realizadas em termociclador BIO-RAD T100TM Thermal Cycler, com ciclos de 95°C – 10 min, 40 ciclos de: 95°C - 15 seg, 60°C - 45 seg, 45°C - 1 min e extensão final de 72°C - 7 min e *hold infinit* a 12°C (Rodrigues *et al.*, 2017).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1x, corados com brometo de etídio e o tamanho do produto de amplificação foi determinado por comparação com um marcador de 100 bp, visualizados sob luz ultravioleta e posteriormente fotografados.

2.5 Análise de dados

Os dados obtidos foram tabulados e analisados utilizando o programa o Excel versão office 365 (Office 365, 2023) utilizando o suplemento para Excel Real Static (Zaiontz, 2023).

A frequência de positividade para cada DNA pesquisado em cada ponto de coleta foi calculada dividindo-se o número de pools positivo por ponto pelo número de pools analisados, multiplicado por 100.

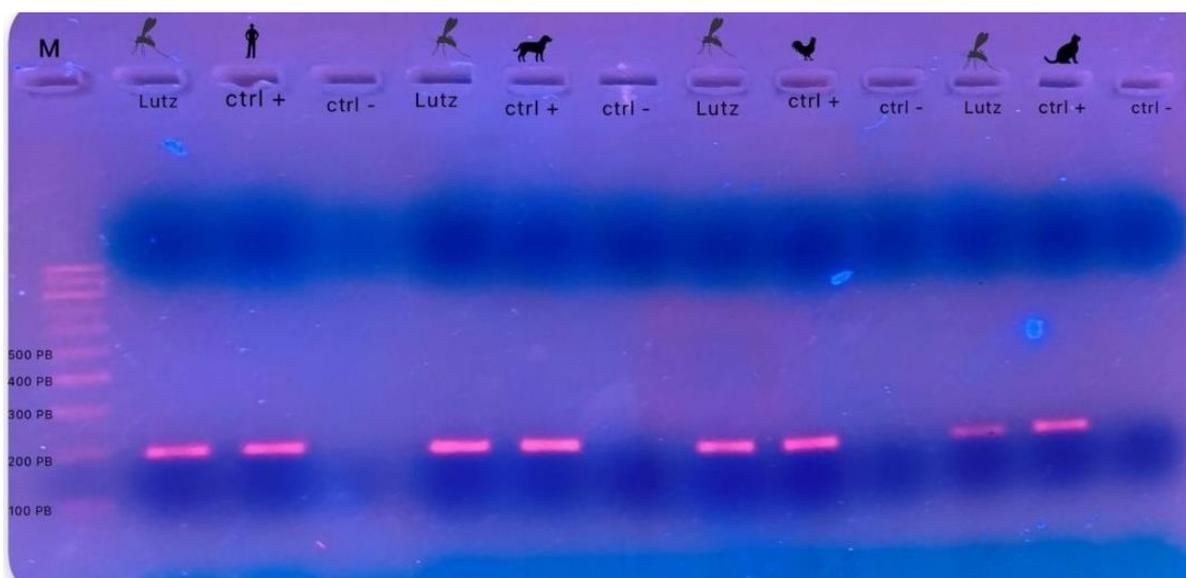
A comparação entre as proporções de positivos para o DNA de cada animal analisado foi realização aplicando-se o teste Z para duas proporções (Ross, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de *pools* analisados por bairro e a frequência de positividade para DNA das espécies animais pesquisadas está demonstrada na Tabela 1, onde observa-se que o DNA de humano e cão foram encontrados com frequência significativamente maior que de gato e galinha, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a frequência de fêmeas com DNA humano e de cão. Refeições mistas de sangue foram encontradas em 26 *pools* (42,6%) analisados, com maior frequência de DNA de humano e cão, que representaram 18,0% (Tabela 2).

Os 61 *pools* foram formados seguindo a ordem de data e local de coleta, desta forma 27 *pools* foram formados por flebotomíneos coletados no intra e peridomicílio (268 fêmeas), 22 *pools* foram compostos por fêmeas capturadas exclusivamente no peridomicílio (227) e 12 por fêmeas capturadas no intradomicílio (115 fêmeas). Nos *pools* originários do peridomicílio em 11 (50%) foi amplificado DNA de humano, 6 (27,3%) DNA de cão e 5 (22,7%) DNA de galinha, enquanto nos *pools* do intradomicílio o DNA humano foi amplificado em 7 (58,3%), de cão em 7 (58,3%), DNA de galinha em 3 (25%) e de gato em 3 (25%). O padrão de banda formado pelos produtos da PCR na eletroforese em gel de agarose, está apresentado na figura 1.

Figura 1 – Gel de agarose corado com brometo de etídio, representativo dos produtos de amplificação obtidos com iniciadores Hmt2 (Humano), Dmt1 (*Canis familiaris*), Camt1 (*Felis silvestres catus*) e Chmt6 (*Gallus gallus*).



M: marcador de peso molecular. (Lutz) amostra de *pool* de flebotomíneos. Ctrl+ (DNA de *Homo sapiens*), ctrl+ (DNA de *Canis familiaris*), ctrl+ (DNA de *Felis silvestres catus*) e ctrl+ (DNA de *Gallus gallus*). (Ctrl-) controle negativo da reação.

Tabela 1 – Frequência de positividade para DNA de diferentes espécies animais em pools de *Lutzomyia longipalpis* capturadas em 8 bairros do município de Araguaína-TO.

| Bairro | Quantidade de fêmeas coletadas | Pools analisados | Fonte alimentar | | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| | | | Humano | | Cão | | Galinha | | Gato | |
| | | | Pools positivos | (%) | Pools positivos | (%) | Pools positivos | (%) | Pools positivos | (%) |
| Presidente Lula | 157 | 15 | 9 | 60,0 | 8 | 53,3 | 3 | 20,0 | 4 | 26,6 |
| Universitário | 87 | 9 | 5 | 55,6 | 3 | 33,3 | 1 | 11,1 | 0 | 0,0 |
| Parque Bom viver | 31 | 3 | 1 | 33,3 | 2 | 66,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Alto Bonito | 22 | 3 | 3 | 100,0 | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Lago Sul | 19 | 2 | 2 | 100,0 | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Xixebal | 99 | 10 | 7 | 70,0 | 1 | 10,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Centro | 193 | 18 | 4 | 22,2 | 2 | 11,1 | 4 | 22,2 | 0 | 0,0 |
| Entroncamento | 2 | 1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Total | 610 | 61 | 29 | 47,50 ^a | 21 | 34,40 ^a | 8 | 13,10 ^b | 4 | 6,50 ^b |

Fonte: Dados da pesquisa, 2023. Valores com letras diferentes apresentaram significância estatística ($P < 0,05$) no teste z.

Tabela 2. Frequência de positividade para DNA de mais de um tipo de hospedeiro, em pools de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de 8 bairros da zona urbana do município de Araguaína, Tocantins, Brasil.

| Bairro | Pools | Humano + Cão | | Humano + Galinha | | Humano + Cão + Galinha | | Humano+ Cão + Gato | |
|------------------|-------|-----------------|------|------------------|--------|------------------------|------|--------------------|------|
| | | pools positivos | (%) | pools positivos | (%) | pools positivos | (%) | pools positivos | (%) |
| Presidente Lula | 15 | 2 | 13,3 | 1 | 6,66 | 1 | 6,7 | 4 | 26,7 |
| Universitário | 9 | 3 | 33,3 | 1 | 11,10 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Parque Bom viver | 3 | 1 | 33,3 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Alto Bonito | 3 | 1 | 33,3 | 2 | 66,60 | 0 | 0,0 | 1 | 33,3 |
| Lago Sul | 2 | 0 | 0,0 | 2 | 100,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Xixebal | 10 | 0 | 0,0 | 1 | 10,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Centro | 18 | 4 | 22,2 | 0 | 0,0 | 2 | 11,1 | 0 | 0,0 |
| Entroncamento | 1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| TOTAL | 61 | 11 | 18,0 | 7 | 11,50 | 3 | 4,9 | 5 | 8,2 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Neste estudo verificou-se que no bairro Presidente Lula todas as espécies animais pesquisadas funcionam como fonte alimentar, demonstrando a adaptação de *Lu. longipalpis* em relação as fontes alimentares disponíveis, não exigindo um hospedeiro específico. Este bairro localiza-se em uma área periférica do município com abundância de vegetação, ausência de pavimentação asfáltica e pobre em urbanização, isso, associado a presença de animais no peridomicílio tornam o bairro ideal para proliferação de *Lu. longipalpis* (Werneck, 2016; Alvarenga *et al.*, 2023).

Os resultados demonstram a fonte alimentar diversificada de *Lu. longipalpis* em áreas da zona urbana de Araguaína, uma vez que o DNA de todas as espécies estudadas foi encontrado entre os espécimes analisados, como observado em outras áreas urbanizadas do Brasil onde estudos foram conduzidos (Dias; Larossa; Rebêlo, 2003; Barata *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2012; Tanure *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2017, Silva *et al.*, 2017).

O humano foi a principal fonte alimentar de *Lu. longipalpis*, corroborando com os hábitos antropofílicos do vetor, já verificados em outros estudos (Souza *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2016; Santini *et al.*, 2017). Resultado semelhante quanto ao repasto sanguíneo em humanos, cães e galinhas foram observados também por Sales, 2015; Carvalho *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019.

O município de Araguaína é considerado um dos prioritários no Estado para as ações de controle e nos últimos anos o encoleiramento dos cães foi realizado em vários bairros do município. As coleiras impregnadas com repelentes protegem os cães das picadas dos flebotomíneos e interrompem o ciclo de transmissão da *Leishmania*, pois, as preparações mais utilizadas são à base de piretróides sintéticos, que além do efeito tóxico, provoca irritação e desorientação nos flebotomíneos, resultando na diminuição da taxa de alimentação (Leite, 2016), o que pode justificar a elevada frequência de *Lu. longipalpis* alimentadas com sangue humano, uma vez que os cães estão mais protegidos.

Como o cão é considerado o principal reservatório urbano da LV e Araguaína é um município classificado como de transmissão intensa da doença, além das ações de prevenção da leishmaniose visceral canina adotadas pelos órgãos públicos, os tutores de forma geral, tendem a seguir as orientações do médico veterinário e adotar medidas de proteção dos animais, com o objetivo de impedir a infecção canina.

O papel das aves como importante fonte alimentar para flebotomíneos foi demonstrada em várias regiões do Brasil onde a leishmaniose é endêmica (Marassá *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013, Baum *et al.*, 2015; Tonelli *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019). A presença de galinheiros no peridomicílio tem sido frequentemente apontada como um fator de risco para

a leishmaniose visceral, pois mesmo não funcionando como reservatório para *Leishmania* spp., em algumas situações as galinhas podem facilitar a aproximação dos flebotomíneos a outros animais domésticos e ao humano, considerando que geralmente os galinheiros são construídos próximos às residências (Tonelli *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019).

O DNA de galinha apareceu como o terceiro tipo de vertebrado mais prevalente e desempenha papel importante na peridomiciliação do vetor funcionando como atrativo (Carvalho *et al.*, 2000) além disso a presença desses animais amplia a oferta de sangue e facilita o segundo e terceiro repasto sanguíneo, podendo potencializar a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* (Elnaiem, Ward e Young, 1994).

Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, Brasil, a presença de anticorpos anti-leishmania em galinhas já foi constatada em áreas de ocorrência da doença, indicando que o contato destes animais com o protozoário durante a alimentação dos flebotomíneos, embora não produza a doença, é suficiente para induzir a produção de anticorpos, possibilitando o uso destes animais como sentinela para a circulação do agente (Tatoo *et al.*, 2023).

Apesar de existir no município de Araguaína uma Lei Municipal Nº 2908, de 09 de maio de 2014, que proíbe a criação de suínos, aves, equinos, caprinos, ovinos e bovinos em domicílio e peridomicílios, existe uma resistência da população em seguir a lei e insuficiência de fiscalização, principalmente nas áreas mais periféricas. Os resultados deste estudo demonstram a importância do controle de populações de galinhas na zona urbana, pois funcionam como fonte alimentar e certamente favorecem a proliferação do vetor.

Na presente pesquisa também foi constatado o gato como fonte alimentar de *Lu. longipalpis*, porém com menor frequência que os demais vertebrados.

Alguns estudos já demonstraram que os gatos servem como fonte de alimento para *Lu. longipalpis* (Ogusuku *et al.*, 1994; Dias; Larossa; Rebêlo, 2003; Coelho *et al.*, 2010, Baum *et al.*, 2013; Soares, 2014; Sales, 2015), porém, não parece ser a fonte alimentar preferencial, corroborando com o que foi observado nesse estudo. O felino doméstico tem hábito feral e sai em busca de alimento a noite, permanecendo em movimento, o que pode desfavorecer a aproximação e o processo de alimentação do flebotomíneo, isso pode justificar a menor frequência de fêmeas alimentadas nesta espécie (Alves, 2021).

Os gatos são hospedeiros de *L. infantum* e podem adoecer e morrer em consequência da leishmaniose visceral felina (Sousa, 2017; Souza *et al.*, 2019), além de funcionarem como reservatório da doença para o cão (Batista, 2019), portanto, enquanto não se esclarece o real papel do gato na epidemiologia da LV os resultados aqui apresentados indicam que medidas

protetivas individuais também devem ser adotadas para estes animais, com o objetivo de evitar a infecção felina.

Vale ressaltar que dentre os bairros pesquisados, os que apresentaram maiores índices de positividade são bairros periféricos, onde as precárias condições de vida e a desassistência por parte do poder público são condições que favorecem a perpetuação da LV (Brasil, 2017; Lima *et al.*, 2020).

Os fatores climáticos são condicionantes essenciais para que os flebotomíneos se desenvolvam. A temperatura cerca de 25°C e 60% de umidade relativa do ar são condições ótimas para o desenvolvimento da espécie *Lu. longipalpis*, condições estas que prevalecem no município pesquisado a maior parte do ano (INMET, 2023).

O encontro de exemplares de *Lu. longipalpis* alimentadas com sangue de diferentes espécies no intra e peridomicílio, corrobora e confirma a domiciliação de *Lu. longipalpis* (Aguiar; Medeiros, 2003). Os resultados encontrados associados a presença do reservatório canino e a ocorrência de casos humanos indicam que os elementos da cadeia de transmissão da LV estão presentes no intradomicílio e peridomicílio ativos na zona urbana nas regiões periféricas e central, mantendo o risco de transmissão, e explicitam a necessidade de monitoramento constante dos casos humanos, reservatórios e vetores, além de reforçar a necessidade de estudos que esclareçam o papel de outras espécies de mamíferos domésticos na cadeia epidemiológica da doença.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que as fêmeas de *Lu. longipalpis* na zona urbana de Araguaína – TO, utilizam como fonte alimentar várias espécies de animais domésticos, porém ocorre maior frequência de alimentação em humanos e cães, demonstrando que o ciclo de transmissão da leishmaniose visceral, na presença do agente causal, pode ser mantido e ações de vigilância direcionadas a proteção destas espécies hospedeiras precisam ser constantes.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C.; CARANHA, L.; RANGEL, E.F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal Tropical Medicine**. 2012.
- AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, V.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. **In: Rangel E F and Lainson R (eds) Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255, 2003.
- ALENCAR, N. M.; DOS SANTOS, A. C.; DE PAULA NETO, J. J.; RODRIGUES, M. O. D.; DE OLIVEIRA, L. B. T. Variabilidade das perdas de solo em Neossolo Quartzarênico sob diferentes coberturas no ecótono Cerrado-Amazônia. **Revista Agrarian**. Dourados, v.12, n.43, p.71-78, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i43.8081>
- ALVARENGA, A.L.; RODRIGUES, A.M.; SILVA, M.Q.; SILVA, L.A.P.; LIMA, D.A. Fatores socioambientais relacionados com a transmissão da leishmaniose visceral canina e humana no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro. **In: CAVALCANTI, Soraya Araújo Uchoa. Saúde pública e saúde coletiva: agenda para debates**. 1 ed. Ponta Grossa - PR: Atena, 2023. 214 f. capítulo 14, p.140 – 150.
- ALVES, M. L. Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2021.
- BARATA, R. A., FRANÇA-SILVA, J. C., MAYRINK, W., SILVA, J. C. DA ., PRATA, A., LOROSA, E. S., FIÚZA, J. A., GONÇALVES, C. M., PAULA, K. M. DE., & DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, vol. 38, n. 5, out. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000500012>.
- BATISTA, J.F. **Leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*) em área endêmica no Brasil**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.
- BAUM, M. et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American Cutaneous Leishmaniasis, Paraná State, Brazil, *Acta Tropica*, 2015;143:8-12.
- BAUM, M.; RIBEIRO, M. C. V. DA C.; LOROSA, E. S.; DAMASIO, G. A. C.; CASTRO, E. A. DE. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, Curitiba, vol. 46, nº5, p. 560–565, September - October, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0157-2013>.
- BOREHAM, P. F. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. **The Journal of tropical medicine and hygiene**. vol. 78, nº 4, p. 83-91, apr., 1975. PMID: 1171257.

BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de desenvolvimento da Epidemiologia em serviços. **Guia de Vigilância em saúde: volume único**. Brasília 2017.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia de Bolso Leishmaniose Visceral– 1. ed, **Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária**. Brasília - DF: CFMV, 2020 194 p.: il.

CARVALHO, G.M.L.; REGO, F. D.; TANURE, A.; SILVA, A.C.P.; DIAS, T. A.; PAZ, G. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Bloodmeal Identification in Field-Collected Sand Flies From Casa Branca, Brazil, Using the Cytochrome b PCR Method. **Journal of Medical Entomology**, vol. 54, n. 4, p. 1049–1054, jul. 2017. DOI: <doi:10.1093/jme/tjx051>.

CARVALHO, M. L.; REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. C.; BARROS, V. L. L. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. **Entomologia y Vectores**, vol. 7, p. 19-32, 2000.

CHAVES, A. F. DE C. P. Leishmaniose visceral no Piauí, 2007-2019: análise ecológica de séries temporais e distribuição espacial de indicadores epidemiológicos e operacionais. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde – Revista do SUS**, v.31, 2022. Doi:< <https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100013>>.

COELHO, W. M. D.; DE LIMA, V.M.F.; DO AMARANTE, A. F. T.; LANGONI, H.; PEREIRA, V. B.; ABDELNOUR, A.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de *Leishmania (Leishmania) Chagasi* em gato doméstico (*Felis cato*) em Andradina, São Paulo, Brasil: relato de caso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, p. 256-258, 2010.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, p. 511, ISBN: 978-85-7541-568-9. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788575415689>.

COSTA, P. L.; DANTAS-TORRES, F.; DA SILVA, F. J.; GUIMARÃES, V. C. F. V.; GAUDÊNCIO, K.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, Recife, vol. 126, n. 2, p. 99-102, mai. 2013. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.01.011>>.

DATASUS. DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. Ministério da Saúde. **Casos confirmados por UF de residência segundo critério de confirmação, período de 2015 a 2019**. Brasília, 2020a.

DATASUS. DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. Ministério da Saúde. **Casos confirmados por ano, notificação segundo município de infecção, período: 2010 a 2019**. Brasília, 2020b.

DE SOUSA, R. L. T.; VASCONCELOS, S. A.; DOS SANTOS-MALLET, J. R.; DO NASCIMENTO, E. F.; TEIXEIRA, C. R. ; SILVA, C. L. M.; FREIRE, S. M.; LEAL, A. R. DA S.; CARDOSO, K. T. DE S. N.; VILELA, M. L.; GOMES, R. B. B. Padrões de fonte alimentar dos Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) vetores das Leishmanioses: uma revisão

bibliográfica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 8, p. e8567, 19 ago. 2021.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n. 5, p.1373-1380, 2003. DOI: <<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000500015>>.

ELNAIEM, D. A.; WARD, R. D.; YOUNG, P. E. Development of *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the second blood-meal of its vector *Lutzomyia longipalpis* {Diptera: Psychodidae). *Parasitol Res*, Liverpool, vol. 80, n. 5, p. 414-419, jan. 1994. DOI: <10.1007/BF00932379>.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Banco de dados 2022. Disponível em: <https://bdmep.inmet.gov.br/>. Acesso em: 08 dezembro. 2023.

JOGAS JUNIOR, D.G. Muito além de uma história das leishmanioses no Novo Mundo. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 30, p. e2023056, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.1590/S0104-59702023000100056>>.

LEI MUNICIPAL Nº 2.908, publicada no DOM nº 591, Ano III, sexta-feira, 09 de maio de 2014. Disponível em: <<https://leis.araguaina.to.gov.br/Lei/2908/856.aspx>>.

LEITE, B.M.M. **Avaliação da eficácia de coleiras impregnadas com deltametrina no controle e prevenção da leishmaniose visceral canina em área endêmica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

LIMA, D. A.; NOVO, DE S. P. C. S., F. N.; MACIEL, E. M. DE S. G. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba – Rio de Janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, v. 10, n. 1, p. 157-174, 2020.

MEDEIROS, J.F. et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 61-68, 2016.
MOREIRA, Nádia das Dores. **História natural da leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de *Leishmania infantum* com perfis distintos de virulência e patogenicidade**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. 2012.

MUKABANA, W.R. ; TAKKEN, W. ; COE, R. *et al.* Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, vol. 1, nº 17, dez.; 2002. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-1-17>.

NASCIMENTO, B.W.L. **Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado). Curso de Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013.

NINA, L. N. DA S.; CALDAS, A. DE J. M.; SOEIRO, V. M. DA S.; FERREIRA, T. F.; SILVA, T. C.; RABELO, P. P. C. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no

Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Publica**. Maranhão, vol. 47, 2023. DOI: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.160>

OGUSUKU, E.; PEREZ, J. E.; PAZ, L.; NIETO, E.; MONJE, J.; GUERRA, H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. Peru, vol. 88, n° 3, p. 329-35, jun., 1994. DOI: <10.1080/00034983.1994.11812873>.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 24, n° 9, p. 2183-2186, setembro, 2008. OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmaniose visceral**. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 07 dez. 2023.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Nº 11 (Dezembro de 2022). Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C; NASCIMENTO, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; MALAFRONTA, R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, p. 252–259, 2006.

REIS, L. L. DOS; BALIEIRO, A. A. DA S.; FONSECA, F. R.; GONÇALVES, M. J. F. Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Caderno de Saúde Pública**, Manaus, v. 35, p. 1:e00047018, 2019. DOI: <10.1590/0102-311X00047018>.

RODRIGUES, E. H. G. *et al.* The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, p. 228-228, 2013.

RODRIGUES, A.C.M *et al.* A new whole mitochondrial genome qPCR (WMG-qPCR) with SYBR Green® to identify phlebotomine sand fly blood meals. **Veterinary Parasitology**, Fortaleza, vol. 238, p. 17–23, 2017. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.007>>.

RODRIGUES, M. H. D.; FIORAVANTE, F. C. R. C.; FERRAZ, J. B. S.; FUKUMASU, H.; SANTOS, H. D.; NEPOMUCENO, L. L., FERREIRA, J. L. Frequências alélicas e genotípicas do gene da beta-caseína do leite em bovinos da raça Curraleiro Pé Duro criados no Estado do Tocantins. **Peer Review**, Araguaína, Vol. 5, Nº 22, 2023. DOI:<10.53660/1282.prw2811>.

SALES, K.G.S. **Real-time PCR for the characterization of feeding sources of sand flies (Diptera: Psychodidae)**. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

SANTINI, M.S.; FERNÁNDEZ, M. S.; CAVIA, R.; SALOMÓN, O. D. Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and

Nyssomyia whitmani in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. **Medicina Veterinária e Entomologia**, v. 32, n. 2, p. 197-205, nov. 2017. DOI:<10.1111/mve.12283>.

SANTOS, H.D.; GALVÃO, S.R.; DIAS, F.E.F.; RIBEIRO, T.M.P.; NEGREIROS FILHO, O.; SOUSA, S.A.P.; et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins. **Brazilian Cienc Rural**. Araguaína, v. 47, n° 3, p. 3–8, 2017.

SANTOS, Walter Souza et al. Flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae) de área endêmica para leishmaniose detectada e visceral no nordeste do estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, Ananindeua, v. 10, e201900059, 2019. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232019000100016&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 07 dez. 2023. Epub 19 de novembro de 2019. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223201900059>.

SILVA, A. S. G. e; SILVA, S. DE O.; DA SILVA, R. C. R.; PINHEIRO, V. C. S.; REBÊLO, J. M. M.; MELO, M. N. Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, Caxias – MA, vol. 12, n. 8, e0179052. aug. 2017. DOI: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179052>>.

SILVA, F. A.; COSTA, D. A.; SILVA, B. H. M.; ALVES, A. F.; DE SOUZA, S. J.; DA SILVA, G. M. B.; MENESES, J. M.; MATOS-ROCHA, T. J.; CHRISTOFFERSEN, M. L.; CAVALCANTI, M. G. S. Identification of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in Atlantic forest fragments and their dispersal to urban area. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, n. 4, p. e20191596, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765202320191596>>.

SOARES, V. Y. R.; SILVA, J. C. DA; SILVA, K. R. DA; CRUZ, M. DO S. P. E.; SANTOS, M. P. D.; RIBOLLA, P. E. M.; ET AL. Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz**, Teresina, vol. 109, n. 03, jun. 2014. DOI: <<https://doi.org/10.1590/0074-0276130405>>.

SOUSA, S. A. P. **Diagnóstico de leishmaniose em *Felis catus domesticus* de área urbana endêmica da região norte do Brasil**. 2017. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BARATA, I.R.; SILVA, M.G.S.; LIMA, J.A.N. et al. The Phlebotominae fauna of Serra dos Carajás, Pará, Brazil, and its possible implication in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. **Rev Pan-Amazônica Saúde**, v.1, p.45-51, 2010.

SVOBODOVA, M.; SÁDLOVA, J.; CHANG, K.P.E.; VOLF, P. Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 1, p. 6-9, 2003.

TANURE, A.; PEIXOTO, J. C.; AFONSO, M. M. dos S. Identification of sandflies (diptera: psychodidae: phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Revista**

do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 57, n. 4, p. 321–324, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400008>.

TATTO, M.; FERNANDES, F. D.; COSTA, E. P.; SHIBUYA, F. Y.; FREITAS, L. I.; OSMARI, V. *et.al.* Detection of anti-Leishmania spp. antibodies in poultry from central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Santa Maria, vol. 32, n. 4, p. e007723, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023077>.

WERNECK, Guilherme L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? *Cad. Saúde Pública* 32 (6) 20 Jun 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00ED010616>.

ZAIONTZ, Charles. Real Statistics Resource Pack for Excel (versão 8.9.1). Direitos autorais (2023). Disponível em: <https://www.real-statistics.com/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

ROSS, Steven Dutt. Como fazer teste para duas proporções no R: Teste z para duas proporções. 2019. [cited 2024 Mar 07]. Disponível em: https://rstudio-pubs-static.s3.amazonaws.com/524071_2d9c3b2c3c1349c7a05d051dcc1aae84.html

CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer e compreender os hábitos alimentares dos parasitos de interesse em saúde pública fornecem importantes evidências epidemiológicas que permitem responder a perguntas sobre comportamento, ecologia e adaptação dos vetores.

A adaptação de *Lutzomyia longipalpis* a novos habitats decorre de sua habilidade de parasitar diferentes espécies animais, utilizando-se daquela fonte alimentar mais disponível em um dado tempo, fator que é determinante no processo de expansão e urbanização, assim como do surgimento de novos perfis epidemiológicos.

Levantar informações a respeito das fontes alimentares dos vetores, colabora com a compreensão da ecoepidemiologia das leishmanioses, uma vez que gera evidências para investigação de possíveis reservatórios que possam estar incriminados no ciclo de transmissão da doença.

É perceptível que a urbanização do vetor tem sido um dos principais gargalos para a efetividade das ações de vigilância e controle da doença, uma vez que a urbanização avança sem planejamento o vetor *Lu. longipalpis* continua se apresentando como o fator mais importante da cadeia de transmissão da LV, sendo um fator biológico de risco, absolutamente fundamental na transformação do perfil epidemiológico, assim como no avanço da urbanização da doença.

Diante das evidências do aquecimento global que trazem grande magnitude e potencializam os efeitos nocivos à saúde das populações, é de suma importância que sejam intensificadas pesquisas norteadas para as doenças relacionadas a mudanças implicadas ao ambiente, sobretudo as que cursam e dependem de vetores para concluir o ciclo de transmissão, como a LV.