

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/01/2020.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

Flávia Benini da Rocha Silva

Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com
***Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida:**
Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)

Araraquara, SP
2018

Flávia Benini da Rocha Silva

**Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com
Leishmania (Viannia) braziliensis (Kinetoplastida:
Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586i

Silva, Flavia Benini da Rocha

Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) / Flavia Benini da Rocha Silva. – Araraquara, 2018.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Parasitologia.

Orientadora: Mara Cristina Pinto.

Coorientador: Danilo Ciccone Miguel.

1. Flebotomíneos. 2. Cairomônios. 3. Leishmaniose. 4. Atratividade. 5. Volume de sangue. I. Pinto, Mara Cristina, orient. II. Miguel, Danilo Ciccone, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

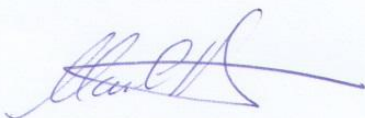
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)

AUTORA: FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA

ORIENTADORA: MARA CRISTINA PINTO

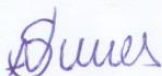
COORIENTADOR: DANILO CICCONE MIGUEL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: PARASITOLOGIA pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, belonging to Mara Cristina Pinto, is positioned above her name and affiliation.

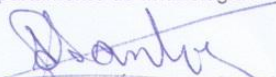
Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, belonging to Anderson de Sá Nunes, is positioned above his name and affiliation.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES

Departamento de Imunologia / Instituto de Ciências Biomédicas da USP

A handwritten signature in blue ink, belonging to André Gonzaga dos Santos, is positioned above his name and affiliation.

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 19 de janeiro de 2018

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Cidinha e Marcelo, por sempre me apoiarem na minha caminhada e sempre me incentivarem a buscar meus objetivos.

À professora e orientadora Mara, essencial para a realização do trabalho. Obrigada pela dedicação, confiança, paciência, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao professor e coorientador Danilo Ciccone Miguel, pelo suporte durante a realização do trabalho.

Ao professor e parceiro Christiann Davis Tosta, por proporcionar a parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) de Matão, tornando possível a realização de parte importante do trabalho.

Aos grandes amigos do laboratório de flebs Thais, Vicente, Wanderson e Camila, por tornarem o laboratório o lugar mais divertido de todos. Obrigada por toda a ajuda e companheirismo.

Aos melhores amigos Estela, Fer, Jhan e Bia, por se tornarem minha segunda família e estarem sempre presentes me dando força ao longo dos anos juntos. Com certeza não seria a mesma coisa sem vocês.

Ao professor João Aristeu da Rosa e aos amigos de laboratório Aline, Ju, Lola, Lucas, Jader e Tiago, pelo conhecimento compartilhado e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo nº 2015/21100-9) e ao CNPq (Processo nº 134406/2015-0).

Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, F. B. R. **Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).** 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos hematófagos denominados flebotomíneos. Dentre as espécies de flebotomíneos, *Nyssomyia neivai* está entre os principais transmissores do agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no estado de São Paulo, sendo incriminado como vetor da LTA também em outras áreas da América do Sul. Para localização dos hospedeiros e realização do repasto sanguíneo, os insetos hematófagos utilizam compostos voláteis emanados pelos mesmos, denominados cairomônios. Embora existam evidências de que a *Leishmania* possa influenciar a quantidade de sangue ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos flebotomíneos, aumentando a taxa de transmissão, não se sabe ao certo como o parasita pode afetar o comportamento dos insetos frente a hospedeiros infectados. O objetivo deste estudo foi investigar se camundongos BALB/c não infectados e infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentam diferença na atratividade para *Ny. neivai*, e nos voláteis emitidos; além disso, buscou-se avaliar o volume de sangue ingerido por *Ny. neivai* nos camundongos infectados e não infectados. Para avaliação de uma possível diferença de atratividade dos flebotomíneos frente a hospedeiros infectados ou não, foram realizados três modelos de teste: (a) preferência alimentar dos flebotomíneos quando colocados dois camundongos na mesma gaiola e com auxílio do corante azul de Evans como marcador para ajudar na identificação da fonte de alimentação de cada flebotomíneo; (b) utilizando os camundongos como fonte de odor em túnel de vento e (c) em tubo em Y. Para os testes realizados em gaiolas, as fêmeas alimentadas foram individualizadas em microtubos, maceradas e homogeneizadas para leitura da absorbância a 540 e 620 nm. Tal leitura permitiu estimar o volume de sangue ingerido por cada fêmea, a partir de curvas analíticas de absorbância *versus* volume de sangue obtidas previamente após realização de ajustes nas diluições. Não houve diferença entre a ingestão de sangue para os dois grupos. Para os testes realizados em túnel de vento, nenhuma fêmea respondeu ao estímulo e para o tubo em Y houve uma resposta de ativação, porém não houve diferença significativa na atratividade dos flebotomíneos para camundongos infectados e não infectados. Para a identificação dos compostos voláteis presentes nos camundongos infectados e não infectados foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida, utilizando-se como amostra 100 mg de pelos retirados da região dorsal de cada animal avaliado. Após padronização para seleção da fibra e tempo de extração, as amostras de pelos foram submetidas a uma temperatura de 90°C em *vials* de 20 mL lacrados e a extração foi realizada por 30 minutos com fibra revestida por polidimetilsiloxano/divinilbenzeno. Os compostos voláteis emitidos pelos camundongos infectados e não infectados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A partir dos resultados obtidos não houve diferença entre o perfil cromatográfico qualitativo de compostos voláteis dos dois grupos de animais, sendo identificados 38 dos 65 compostos voláteis presentes, com auxílio de bibliotecas de espectros de massas de compostos (NIST

08, NIST 98v101, Wiley MS 229 e FFNSC 1.3) e comparação dos índices de retenção.

Palavras-chave: Flebotomíneos. Cairomônios. Leishmaniose. Atratividade. Volume de sangue.

ABSTRACT

SILVA, F. B. R. **Study on attractiveness of infected host with *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).** 2018. 80 f. Dissertation (Master degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Leishmaniasis are zoonosis caused by flagellated protozoa of *Leishmania* genus, transmitted by hematophagous insects called sand flies. Among sand flies species, *Nyssomyia neivai* is one of the main vectors or etiological agent of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the state of São Paulo, being incriminated as vector of ACL also in other areas of South America. For location of hosts and blood meal, hematophagous insects use volatiles compounds released by the hosts, called kairomones. Although there are evidences that *Leishmania* may influence the quantity of blood ingested and the frequency of blood meal of the sand flies, increasing transmission rate, it is not known how the parasite can affect the behaviour of these insects against infected hosts. The aim of this study was to investigate if uninfected and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infected BALB/C mice presents any difference of attractiveness to *Ny. neivai*, and in the released volatiles; besides that, was evaluated the blood volume ingested by *Ny. neivai* on infected and uninfected mice. To evaluate the attractiveness of sand flies to infected and not infected hosts, three types of trials were performed: (a) food preference of sand flies when placed two anesthetized mice in the same cage and Evans blue dye as a marker to help identification of the blood meal source of each sand fly; (b) mice as odour source in wind tunnel and (c) in Y-tube olfactometer. For the trials in the cages, feed females were individualized in micro tubes, macerated and homogenized for absorbance reading at 540 and 620 nm. Such reading allowed estimate the blood volume ingested for each feed female, from standard curves of absorbance versus blood volume previously obtained after adjustments on dilutions. There was no difference on the blood ingested by insects from the two groups of mice. For the trials in wind tunnel, no females respond to stimulus and for the Y-tube olfactometer there was an activation response. However, there was no significant difference on attractiveness of sand flies to infected and uninfected mice. To identify volatiles presented by the two groups of animals was used solid phase micro extraction technique, with an amount of 100 mg of hair from dorsal region of each mouse. After standardization for selection of the fiber coating and time of extraction, the hair samples were submitted to a temperature of 90°C in 20 mL sealed vials and extraction was realized for 30 minutes with fiber coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene. Volatiles released by the infected and uninfected mice were evaluated by gas chromatography-linked mass spectrometry, and there was no difference on the chromatographic profile of volatiles released by the two groups of animals. Of 65 compounds obtained, 38 were identified by libraries (NIST 08, NIST 98v101, Wiley MS 229 and FFNSC 1.3) and retention index.

Keywords: Sand flies. Kairomones. Leishmaniasis. Attractiveness. Blood volume.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral de fibra para SPME.	18
Figura 2. Cronograma geral das etapas realizadas durante a execução experimental do estudo.....	22
Figura 3. (A) Fêmea ingurgitada e (B) macho de <i>Ny. neivai</i>	22
Figura 4. Pata posterior esquerda com edema observado no sítio de infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	24
Figura 5. Camundongos injetados com corante azul de Evans e PBS.....	25
Figura 6. Esquema de túnel de vento utilizado em testes de atratividade em laboratório.	26
Figura 7. Tubo em Y com camundongo infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente em um mesmo sistema.	27
Figura 8. Conjuntos de tubo em Y com camundongos infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente de forma isolada com o ar como controle (C).	28
Figura 9. Diluição seriada para obtenção das curvas padrão. (A) sangue+PBS; (B) sangue+azul de Evans.	29
Figura 10. Fêmeas ingurgitadas de <i>Ny. neivai</i> : (A) sangue + corante azul de Evans; (B) sangue + PBS.....	30
Figura 11. Caixa de acrílico utilizada para a extração dos voláteis dos camundongos. Seta indica local de inserção das fibras para realização da extração.	32
Figura 12. Fibras de SPME utilizadas para padronização da extração dos voláteis dos camundongos. Da esquerda para a direita: DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB; CAR/PDMS e PA.....	33
Figura 13. Vial de <i>headspace</i> com pelos de camundongo sob aquecimento para extração dos voláteis.....	34
Figura 14. Vials de <i>headspace</i> aquecidos para extração dos voláteis dos diferentes grupos, da esquerda para a direita: branco, camundongo não infectado e camundongo infectado.	35
Figura 15. Evolução de lesão na pata posterior esquerda de camundongos Balb/C infectados com promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> . As barras representam o desvio padrão entre a média de cinco animais.....	37
Figura 16. Número de fêmeas atraídas por cada um dos camundongos apresentados individualmente no teste em tubo em Y.....	39
Figura 17. Curvas analíticas de absorbância <i>versus</i> volume de sangue: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.	40
Figura 18. Volume de sangue ingerido por fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) ($p=0,69$).	40
Figura 19. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) para verificação das curvas padrão.....	41
Figura 20. Curvas analíticas de absorbância <i>versus</i> volume de sangue após ajuste da diluição: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.....	42

Figura 21. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) após o ajuste da diluição ($p = 0,0760$).....	43
Figura 22. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas que se alimentaram em camundongos infectados e não infectados ($p = 0,8303$).	43
Figura 23. Cromatogramas obtidos nas extrações realizadas em caixa de acrílico e fibra DVB/CAR/PDMS por 90 min.	44
Figura 24. Número de picos totais obtidos para as diferentes fibras testadas.	45
Figura 25. (A) Número de picos totais e (B) área total dos picos para os diferentes tempos de extração.....	46
Figura 26. Cromatogramas obtidos para as três extrações realizadas: (A) controle negativo, (B) camundongo não infectado e (C) camundongo infectado. Picos identificados numerados, excluindo-se os contaminantes (*).	47
Figura 27. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis identificados a partir das amostras de pelos de camundongos BALB/c não infectados e infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> . I1, I2 e I3: camundongos infectados; NI1, NI2 e NI3: camundongos não infectados.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras de SPME utilizadas no presente estudo.....	18
Tabela 2. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo não infectado (n=30) (p = 0,2462).	38
Tabela 3. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo infectado (n=30) (p = 0,8541).....	38
Tabela 4. Valores de absorbância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans.	41
Tabela 5. Valores de absorbância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans após o ajuste da diluição.....	42
Tabela 6. Compostos tentativamente identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (t_R), seus respectivos índices de retenção (IR) e área relativa média (AR). IR da literatura foram obtidos por meio da biblioteca online WebNIST.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Leishmanioses	12
1.2	Flebotomíneos	13
1.3	Cairomônios	14
1.4	Cairomônios em hospedeiros infectados	16
1.5	Microextração em fase sólida	17
1.6	Justificativa	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Flebotomíneos	22
3.2	Infecção dos camundongos	23
3.2.1	Confirmação da infecção	23
3.3	Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos	24
3.3.1	Preferência alimentar	24
3.3.2	Alocados em túnel de vento	26
3.3.3	Alocados em tubo em Y	27
3.3.3.1	Camundongos apresentados simultaneamente	27
3.3.3.2	Camundongos apresentados isoladamente	27
3.4	Obtenção de curvas analíticas e estimativa do volume de sangue ingerido pelos insetos	28
3.4.1	Ajuste da diluição	30
3.4.2	Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos	31
3.5	Identificação dos voláteis emitidos pelos animais	31
3.5.1	Caixa de acrílico	31
3.5.2	Padronização da metodologia de extração	32
3.5.2.1	Seleção da fibra de SPME	33
3.5.2.2	Tempo de extração	34
3.5.3	Extração dos voláteis por aquecimento	35
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.7	ÉTICA	36
4	RESULTADOS	37

4.1 Infecção dos camundongos	37
4.1.1 Confirmação da infecção	37
4.2 Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos	37
4.2.1 Preferência alimentar	37
4.2.2 Alocados em túnel de vento	38
4.2.3 Alocados em tubo em Y	38
4.3 Obtenção de curvas analíticas e avaliação do volume de sangue ingerido pelos insetos	39
4.3.1 Ajuste da diluição	42
4.3.2 Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos	43
4.4 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais	44
4.4.1 Caixa de acrílico	44
4.4.2 Padronização da metodologia de extração	44
4.4.2.1 Seleção da fibra de SPME	44
4.4.2.2 Tempo de extração	45
4.4.3 Extração dos voláteis por aquecimento	46
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	64
APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAR	64
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos para os diferentes revestimentos das fibras testadas durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis. (A) PA; (B) CAR/PDMS; (C) DVB/CAR/PDMS; (D) PDMS/DVB.	65
APÊNDICE C – Cromatogramas obtidos para os diferentes tempos testados durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis com fibra revestida por PDMS/DVB. (A) 18 minutos; (B) 30 minutos; (C) 40 minutos.	67
APÊNDICE D – Cromatogramas obtidos na diferentes réplicas para as três amostras. (A) controle negativo; (B) e (C) camundongo não infectado; (D) e (E) camundongo infectado.	68
APÊNDICE E – Estruturas moleculares dos compostos voláteis identificados e comparação dos espectros de massas dos compostos (superiores) com as	

bibliotecas utilizadas (inferiores). Porcentagens indicam o grau de similaridade dos compostos e os contaminantes identificados encontram-se sinalizados (*). 70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que são divididos nos subgêneros *Leishmania* Saf'Janova, 1982, *Viannia* Lainson & Shaw, 1987, *Sauroleishmania* Ranque, 1973 e *Mundinia* n. subgen. Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 (WHO, 2017; ESPINOSA et al., 2016). Dentre tais subgêneros, apenas os parasitas dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e uma espécie de *Mundinia*, na Tailândia, são capazes de infectar os seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016; STEVERDING, 2017).

Apesar das leishmanioses causarem manifestações patológicas relevantes para o ser humano, o mesmo não apresenta importância na manutenção do ciclo do parasita na natureza, uma vez que é considerado um hospedeiro acidental (CONTIJO & DE CARVALHO, 2003), com exceção de infecções por *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran & Mesnil, 1903 no subcontinente indiano, para as quais não se conhecia nenhum reservatório silvestre ou doméstico (LAINSON, 1988; URANW et al., 2013). Estudos recentes tem demonstrado uma alteração nesse perfil, com uma pequena taxa de animais infectados por *L. (L.) donovani* na Índia, tais como cabras (SINGH et al., 2013) e cães domésticos (JAMBULINGAM et al., 2017).

Clinicamente, as leishmanioses se apresentam como: visceral e tegumentar. Endêmicas em 97 países e distribuídas mundialmente, as leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas e estimam-se cerca de 50 a 90 mil novos casos na forma visceral e 0,6 a 1 milhão na forma tegumentar por ano, com um bilhão de pessoas vivendo em áreas com risco de transmissão (WHO, 2017).

Apesar de estar amplamente distribuída pelo mundo, aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados em seis países (Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil) e quase 75% dos casos de leishmaniose cutânea estão concentrados em apenas 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão, Peru e Síria (ALVAR et al., 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode manifestar-se de três formas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Acomete principalmente a pele,

mucosas e cartilagens, podendo produzir deformidades e apresentar impactos nos campos social e econômico devido ao seu envolvimento psicológico (BRASIL, 2007).

No Brasil, observou-se um aumento no número de casos de LTA registrados a partir da década de 80, quando passou a ser considerada de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde, além de uma expansão com a confirmação de casos autóctones em todos os estados do país a partir do ano de 2003, tendo como principal agente etiológico a *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 (BRASIL, 2007).

No período entre 1990 e 2016 foram registrados 687.780 casos de LTA, com oscilações ao longo dos anos e uma média de 25.473 casos anuais e com 12.690 casos no ano de 2016 (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são transmitidas por insetos hematófagos denominados flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).

1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (2-3 mm de comprimento), apresentam o corpo recoberto por cerdas, são holometábolos e além de utilizarem carboidratos como fonte de energia, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação de seus ovos (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Durante o repasto sanguíneo, a saliva dos flebotomíneos gera uma grande reação inflamatória, tornando suas picadas um fator de incômodo, principalmente em áreas endêmicas, além de ser capaz de causar uma exacerbação na infecção por *Leishmania* (SACKS; KAMHAWI, 2001; ABDELADHIM et al., 2014).

A quantidade de sangue ingerida durante o repasto sanguíneo é capaz de determinar diferentes fatores importantes para a sobrevivência dos insetos, tais como número de ovos produzidos, frequência da busca por um hospedeiro e da quantidade de picadas, além de influenciar na quantidade que determinados patógenos podem ser adquiridos a partir de um hospedeiro infectado (BRIEGEL et. al., 1979).

Atualmente, existem quase 1.000 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, das quais 530 ocorrem nas Américas e aproximadamente 20 espécies são consideradas como vetores das leishmanioses no Novo Mundo (BRAZIL et al., 2015; SHIMABUKURO et al., 2017).

Dentre as espécies de flebotomíneos, *Nyssomyia neivai* Pinto, 1926 está entre os principais transmissores da LTA no estado de São Paulo, podendo ser encontrado em 42 municípios do estado, dos quais 93% apresentam casos notificados da doença (SHIMABUKURO et al., 2010). Além de estar presente na região de Araraquara (MARCONDES et al., 1998; ANDRADE FILHO et al., 2007; PINTO et al., 2011), *Ny. neivai* já foi encontrado naturalmente infectado por *Leishmania (Viannia)* spp no Brasil (MARCONDES et al., 2009; PITA-PEREIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011) e tem sido incriminado como vetor da LTA nas Américas do Sul e Central (READY, 2013; BRAZIL et al., 2015).

Além de ter se mostrado susceptível à infecção por *L. (V.) braziliensis*, reafirmando seu papel como vetor da LTA (DINIZ et al., 2014), o comportamento alimentar oportunista das fêmeas de *Ny. neivai* demonstra a sua importância no ciclo de transmissão da doença, principalmente em áreas peridomiciliares em que estão presentes possíveis reservatórios do parasita (DIAS-SVERSUTTI et al., 2007; MARASSÁ et al., 2013).

1.3 Cairomônios

A ecologia química é responsável pelo estudo das interações mediadas por compostos químicos, sejam elas intra ou interespecíficas. Tais substâncias responsáveis por essas interações são denominadas semioquímicos, que são subdivididos em feromônios (intraespecíficos) e aleloquímicos (interespecíficos) (ZARBIN et al., 2009).

Dentre os aleloquímicos, os cairomônios são compostos voláteis liberados por um organismo que desencadeiam uma resposta benéfica para organismos de outra espécie (PITTS et al., 2014). No caso dos insetos hematófagos, esses voláteis são utilizados para sinalizar a presença dos hospedeiros (HAMILTON, 2008). O desenvolvimento de iscas atrativas utilizando os compostos identificados pode ter aplicação no monitoramento e/ou controle desses insetos, principalmente em áreas endêmicas da doença onde estão presentes os vetores em maior densidade (LOGAN; BIRKETT, 2007).

A partir da identificação de cairomônios, tais compostos podem ser testados em aparatos utilizados para mensurar a atratividade de insetos, tais como os olfatômetros e túneis de vento. Nesses aparatos, a fonte de estímulo é colocada distante do inseto e, geralmente, há a presença de fluxo de ar que direciona os

voláteis para o inseto (OMRANI et al., 2010). Nesse tipo de experimento, no caso de insetos hematófagos, avalia-se a preferência dos insetos por voláteis dos hospedeiros e infere-se, indiretamente, que houve uma escolha para a hematofagia. Entretanto, quando o objetivo é avaliar, em hospedeiros colocados lado a lado em um mesmo ambiente, se além da escolha pelos voláteis, haverá a efetivação do processo hematofágico é uma maneira de diferenciar a fonte de alimentação de cada inseto.

Dentro dessa perspectiva, MACIEL et al. (2014) padronizaram e validaram uma metodologia para *Aedes aegypti* onde um dos animais é inoculado intravenosamente com corante Azul de Evans para discriminação da alimentação sanguínea em animais de laboratório, quando estes são colocados no mesmo ambiente. O corante se liga à albumina plasmática de maneira irreversível tornando possível diferenciar visualmente a fonte de alimentação de cada inseto.

Além de permitir a distinção da fonte de alimentação, o corante não interfere na atratividade dos insetos, contribuindo para avaliar a eficácia de repelentes ou de atrativos. No presente trabalho, foi utilizada a mesma técnica de MACIEL et al. (2014) com adaptações para flebotomíneos.

Com relação aos trabalhos envolvendo cairomônios para flebotomíneos, são focados principalmente: CO₂, ácido láctico e 1-octen-3-ol, seja em estudos de campo ou em testes de atratividade em laboratório.

A atratividade dos flebotomíneos ao CO₂ está diretamente relacionada ao tamanho dos hospedeiros. Quando avaliados hospedeiros de diferentes tamanhos, foi observada uma maior atratividade de hospedeiros de maior tamanho para *Lu. longipalpis* (QUINNELL et al., 1992) e *Phlebotomus duboscqi* (KASILI et al., 2009).

Quando comparada a atratividade do CO₂ com a do ser humano em situação de campo para *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, o CO₂ foi capaz de atrair um número equivalente a aproximadamente 50% dos insetos que foram atraídos pelo ser humano (PINTO et al., 2001).

Para *Ph. papatasi*, o CO₂ demonstrou ser mais atrativo do que o octenol para coletas realizadas em campo (BEAVERS et al., 2004), principalmente quando associado a luz ultravioleta (MÜLLER et al., 2015).

O octenol é um cairomônio que apresenta uma boa taxa de atratividade para *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai*, tanto em campo (ANDRADE et al., 2008; PINTO et al., 2011) quanto em testes em laboratório com túnel de vento (PINTO et al., 2012;

MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014b), sendo observada uma resposta dose-dependente de tal composto.

Já para o ácido láctico, foram obtidas respostas de atratividade muito baixas para *Lu. longipalpis* em campo (ANDRADE et al., 2008) e para *Ny. neivai* em testes realizados em túnel de vento (PINTO et al., 2012).

1.4 Cairomônios em hospedeiros infectados

Alguns estudos têm mostrado que hospedeiros infectados por parasitas podem liberar compostos diferentes daqueles não infectados, influenciando assim na atratividade de tais hospedeiros para insetos hematófagos. Diferentes espécies de culicídeos transmissores da malária apresentaram uma maior atração por hospedeiros contaminados com *Plasmodium* spp (LACROIX et al., 2005; CORNET et al., 2013a; BATISTA et al., 2014; DE MORAES et al., 2014).

DE MORAES et al. (2014) também identificaram cinco compostos presentes em maior quantidade (ácido hexanóico, 2-fenil-etanol, ácido 2-metil butanoico, ácido 3-metil butanoico e tridecano) e um composto presente em menor quantidade (benzotiazol) em camundongos na fase crônica de infecção por *Plasmodium chabaudii*, agente etiológico da malária em roedores. Quando avaliada a atração de *Anopheles stephensi* frente a esses compostos, somente o 2-fenil-etanol não gerou um aumento da resposta dos insetos. Em contrapartida, o benzotiazol gerou uma redução na resposta dos insetos.

Além da diferença dos voláteis presentes em camundongos infectados e não infectados, também foi constatado que a presença de gametócitos no hospedeiro infectado também é capaz de aumentar a atratividade desses hospedeiros (LACROIX et al., 2005; BATISTA et al., 2014; DE MORAES et al., 2014).

Para flebotomíneos, embora existam evidências de que a *Leishmania* possa manipular a quantidade de sangue ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos insetos, aumentando a taxa de transmissão (ROGERS; BATES, 2007; ROGERS, 2012), não se sabe ao certo se, ou como, a *Leishmania* pode afetar o comportamento dos insetos frente a hospedeiros contaminados.

Ao avaliar a resposta de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor do agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas do Sul e Central, frente a

hospedeiros infectados ou não por *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, sugere-se que a maior atração do inseto pelo hospedeiro contaminado ocorra devido a uma alteração dos odores do hospedeiro mediada pelo parasita (O'SHEA et al., 2002), porém não foram identificados os compostos que poderiam estar envolvidos nessa maior atratividade.

Em um estudo recente, foi avaliada a atração de *Lu. longipalpis* frente aos odores extraídos de hamsters antes da infecção e após um período de latência de infecção por *L. infantum chagasi*. Em tais testes realizados em tubo em Y (um dos tipos de olfatômetros), os flebotomíneos apresentaram uma preferência pelos odores extraídos dos hamsters após as manifestações clínicas da doença, reforçando a presença de uma maior atratividade de hospedeiros infectados (NEVATTE et al., 2017).

Quando avaliados os compostos voláteis presentes em amostras de pelos de cães infectados ou não por *L. infantum chagasi*, foram identificados seis compostos que podem ser considerados como potenciais biomarcadores de infecção pelo parasita: octanal, nonanal, β -hidroxietil fenil éter, decanal, heptadecano e 2-etil-hexil salicilato (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a).

1.5 Microextração em fase sólida

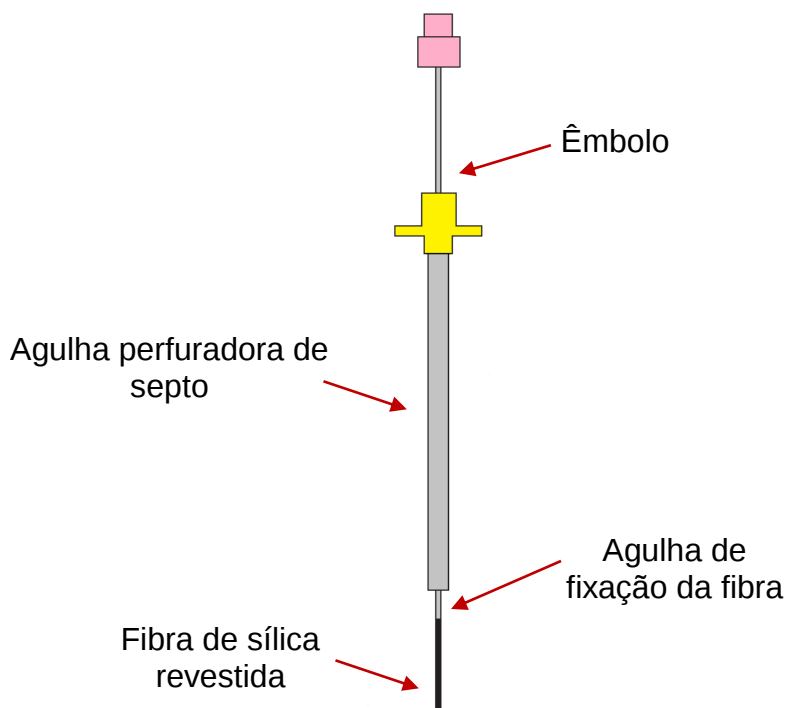
O sistema de microextração em fase sólida (Solid Phase Microextraction – SPME) para o preparo de amostras foi desenvolvido inicialmente para a determinação de poluentes do ar atmosférico (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). O princípio da técnica baseia-se na adsorção de voláteis em polímeros específicos e a posterior dessorção desses compostos para análise química.

Além de não envolver o uso de solventes para extração das amostras voláteis, o sistema de SPME reduz o tempo de preparação das amostras e aumenta a sensibilidade das análises, sendo associado principalmente a detectores de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) (ZHANG; LI, 2010) para posterior separação e identificação dos analitos.

A técnica de SPME é realizada por meio de uma fibra de sílica protegida por um tubo hipodérmico e presa a um êmbolo (Figura 1). A fibra de sílica é responsável por adsorver os compostos voláteis presentes na amostra, sendo exposta somente no momento da extração da amostra e da injeção no cromatógrafo para análise (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Os compostos da amostra a ser analisada podem ser extraídos por meio de extração direta ou *headspace* (mais utilizada). Na extração direta a fibra é colocada em contato direto com a amostra e na extração por *headspace* os voláteis são extraídos do espaço existente entre a amostra e o local onde a fibra é inserida (PAWLISZYN, 2012).

Figura 1. Esquema geral de fibra para SPME.



Adaptado de: SHIREY RE, 2012. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In: PAWLISZYN J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Elsevier. 4: 99-133.

As fibras de SPME disponíveis comercialmente podem apresentar diferentes tipos de revestimentos da fibra de sílica, cada um com diferentes características (Tabela 1) (SHIREY, 2012; SUPELCO INC., 2017a).

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras de SPME utilizadas no presente estudo.

Revestimento	Espessura	Polaridade	Temperatura de dessorção recomendada (°C)
CAR/PDMS	85 µm	bipolar	250 – 310
PDMS/DVB	65 µm	bipolar	200 – 270
PA	85 µm	polar	220 – 300
DVB/CAR/PDMS	50/30 µm	bipolar	230 – 270

CAR: Carboxen™; PDMS: polidimetilsiloxano; DVB: divinilbenzeno; PA: poliacrilato.

Além dos revestimentos da Tabela 1, também estão disponíveis comercialmente fibras revestidas por CAR/PDMS (75 µm), PDMS (7, 30 e 100 µm), PDMS/DVB (60 µm), PEG (60 µm).

Quando o perfil da amostra a ser analisada é desconhecido, diferentes tipos de fibras devem ser avaliadas para encontrar a mais eficiente na extração dos voláteis de tal amostra, uma vez que cada um dos revestimentos irá ser mais compatível com determinadas classes de compostos químicos (SUPELCO INC., 2017b).

Com a expansão do uso da técnica de SPME, podem ser obtidas amostras de compostos voláteis de produtos naturais (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007), de cães (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a), de urina de camundongos (KWAK et al., 2009) e até mesmo de seres humanos (GALLAGHER et al., 2008; DORMONT et al., 2013).

Para insetos hematófagos, a técnica de SPME já foi empregada para a identificação de compostos presentes nas fezes de *Cimex lectularius* (OLSON et al., 2015), em glândulas de *Triatoma dimidiata* (MAY-CONCHA et al., 2015) e de *Triatoma infestans* (GONZÁLEZ AUDINO et al., 2006).

Em outras classes de insetos, a SPME foi utilizada principalmente para avaliação de voláteis de pragas agrícolas, tais como para a análise química da secreção adesiva de *Nicrophorus vespilloides*, *Nicrophorus nepalensis*, *Sagra femorata* e *Gromphadorhina portentosa* (GERHARDT et al., 2016) e de *Schistocerca gregaria* (REITZ et al., 2015), identificação de feromônios sexuais de *Ancistrotermes dimorphus* (WEN et al., 2015) e de *Eurytoma amygdali* (MAZOMENOS et al., 2004), feromônio de agregação de *Diocalandra frumenti* (VACAS et al., 2016) e de feromônio de *Heliothis virescens* e *Heliothis subflexa* (LIEVERS; GROOT, 2016).

1.6 Justificativa

Como salientado anteriormente, para culicídeos, transmissores de *Plasmodium* spp, os dados de literatura apontam para uma maior atratividade dos hospedeiros infectados. Para os flebotomíneos e *Leishmania* spp, somente três artigos tratam desse assunto: dois com hamsters infectados e outro com pelos de cães infectados ou não.

No entanto, tais trabalhos envolvendo flebotomíneos e hospedeiros infectados foram realizados com *Lu. longipalpis* e *L. infantum chagasi*, que são o vetor e o agente etiológico da leishmaniose visceral, não havendo portanto nenhum conhecimento a respeito da atratividade de hospedeiros infectados por nenhum dos agentes etiológicos da LTA.

Além da pequena quantidade de estudos sobre o tema, apenas o trabalho realizado com pelos de cães infectados ou não identificou os voláteis emitidos pelos diferentes grupos de cães, conseguindo inclusive identificar um determinado grupo de biomarcadores de infecção.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Para os testes de atratividade, não foi possível verificar a existência de uma diferença na atratividade de *Ny. neivai* frente a hospedeiros não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis*, tanto nos testes realizados com os camundongos alocados em gaiolas, quanto para os testes no tubo em Y.
- ✓ Apesar dos resultados não demonstrarem diferença na atratividade de *Ny. neivai* frente aos camundongos infectados e não infectados, dentre os testes de atratividade foi obtido um melhor resultado para os testes realizados no tubo em Y.
- ✓ Após ajuste de diluição, não foi observada diferença na quantidade de sangue ingerido pelas fêmeas alimentadas nos camundongos infectados e não infectados.
- ✓ O perfil de voláteis apresentado pelos camundongos infectados e não infectados não demonstrou diferença entre os compostos presentes nos dois grupos de animais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não fizessem parte dos objetivos iniciais do trabalho, destacamos algumas padronizações que se mostraram necessárias para o desenvolvimento do mesmo: padronização das metodologias para avaliação do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos e avaliação do melhor tempo de extração da fibra de SPME assim como o revestimento mais adequado.

Devido ao menor volume ingerido pelos flebotomíneos, após determinados reajustes na diluição inicialmente estabelecida para avaliação do volume de sangue ingerido por culicídeos, foi possível padronizar a metodologia para avaliação do volume de sangue ingerido pelas fêmeas de flebotomíneos em cada um dos grupos de camundongos.

Para avaliação dos compostos voláteis emitidos pelos camundongos infectados e não infectados, após a padronização da metodologia de extração de voláteis dos pelos aquecidos de camundongos com auxílio das fibras de SPME foi possível estabelecer um tempo de extração de 30 minutos e a utilização da fibra revestida por PDMS/DVB.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infect Genet Evol.** v. 28, p. 691-703, 2014.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n 3, p. e0004349, 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE FILHO, J. D. et al. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 102, n. 4, p. 481-487, 2007.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal Chem.** v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- BATISTA, E. P. et al. *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) displays increased attractiveness to infected individuals with *Plasmodium vivax* gametocytes. **Parasit Vectors.** v. 7, p. 251, 2014.
- BERNIER, U. R. et al. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Anal Chem.** v. 72, n. 4, p. 747-756, 2000.
- BERNIER, U. R. et al. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Am Mosq Control Assoc.** v. 18, n. 3, p. 186-195, 2002.
- BRASIL. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.** 1990 a 2016. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. setembro 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf> >.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana /** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p.: il. 2007. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5. Disponível em: < http://www.crmv-mt.org.br/images/bt-arise/Artigos/manual_lta_2ed.pdf >.
- BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Em: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz. v. 4, p. 257-274, 2003.
- BRAZIL, R. P. et al. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – A mini review. **Entomol Ornithol Herpetol.** v. 4, n. 2, p. 144, 2015.

BRIEGEL, H. et al. Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal sizes of mosquitoes (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** v. 15, n. 3, p. 235-238, 1979.

CARREGARO, V. et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiol.** v. 13, p. 102, 2013.

CONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

CORNET, S. et al. Malaria infection increases bird attractiveness to uninfected mosquitoes. **Ecol Lett.** v. 16, n. 3, p. 323-329, 2013a.

CORNET, S. et al. Both infected and uninfected mosquitoes are attracted toward malaria infected birds. **Malar J.** v. 12, p. 179, 2013b.

DE BOER, J. G. et al. Odours of *Plasmodium falciparum*-infected participants influence mosquito-host interactions. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, p. 9283, 2017.

DE MORAES, C. M. et al. Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 111, n. 30, p. 11079-11084, 2014.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: a new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 875, n. 2, p. 392-398, 2008.

DIAS-SVERSUTTI, A. C. et al. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em Área Rural do Paraná. **Neotrop Entomol.** v. 36, n. 6, p. 953-959, 2007.

DINIZ, M. M. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasit Vectors.** v. 7, p. 139, 2014.

DORMONT, L. et al. Human skin volatiles: a review. **J Chem Ecol.** v. 39, n. 5, p. 569-578, 2013a.

DORMONT, L. et al. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-pathogen-vector interactions. **J Exp Biol.** v. v216, Pt 15, p. 2783-2788, 2013b.

EMAMI, S. N. et al. A key malaria metabolite modulates vector blood seeking, feeding, and susceptibility to infection. **Science.** v. 355, n. 6329, p. 1076-1080, 2017.

ERHARDT, W. et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). **Res Exp Med.** v. 184, n. 3, p. 159-169, 1984.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**. v. 15, p. 1-13, 2016.

FONTAN, A. et al. Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. **J Med Entomol**. v. 39, n. 1, p. 191-197, 2002.

GALLAGHER, M. et al. Analyses of volatile organic compounds from human skin. **Br J Dermatol**. v. 159, n. 4, p. 780-791, 2008.

GERHARDT, H. et al. Insect Adhesion Secretions: Similarities and Dissimilarities in Hydrocarbon Profiles of Tarsi and Corresponding Tibiae. **J Chem Ecol**. v. 42, n. 8, p. 725-738, 2016.

GONZÁLEZ AUDINO, P. et al. Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. **J Vector Ecol**. v. 32, n. 1, p. 75-82, 2007.

GOULART, T. M. et al. Breeding protocol for the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. **Acta Trop**. v. 174, p. 102-105, 2017a.

GOULART, T. M. et al. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **Parasit Vectors**. v. 8, n. 1, p. 423, 2015.

GOULART, T. M. et al. Solid phase microextraction, sand flies, oviposition pheromones, plaster of Paris and siloxanes-What is in common? **Acta Trop**. v. 168, p. 50-53, 2017b.

GUERENSTEIN, P. G.; GUERIN, P. M. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. **J Exp Biol**. v. 204, Pt 3, p. 585-597, 2001.

HAMILTON, J. G. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. **Parasite**. v. 15, n. 3, p. 252-256, 2008.

HAMILTON, J. G.; RAMSOONDAR, T. M. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. **Med Vet Entomol**. v. 8, n. 4, p. 375-380, 1994.

INNOCENT, E. et al. Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito, *Anopheles gambiae* s.s. **J Insect Sci**. v. 10, p. 57, 2010.

JAMBULINGAM, P. et al. Domestic dogs as reservoir hosts for *Leishmania donovani* in the southernmost Western Ghats in India. **Acta Trop**. v. 171, p. 64-67, 2017.

KELLY, M. et al. Malaria parasites produce volatile mosquito attractants. **MBio**. v. 6 n. 2, p. e00235-15, 2015.

KNOLS, B. G. et al. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 89, n. 6, p. 604-606, 1995.

KWAK, J. et al. Major histocompatibility complex-regulated odortypes: peptide-free urinary volatile signals. **Physiol Behav.** v. 96, n. 1, p. 184-188, 2009.

LACROIX, R. et al. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. **PLoS Biol.** v. 3, n. 9, p. e298, 2005.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 321, n. 1207, p. 389-404, 1988.

LEAL, W. S. et al. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. **PLoS One.** v. 3, n. 8, p. e3045, 2008.

LIEVERS, R.; GROOT, A. T. Disposable Polydimethylsiloxane (PDMS)-coated fused silica optical fibers for sampling pheromones of moths. **PLoS One.** v. 11, n. 8, p. e0161138, 2016.

LOGAN, J. G.; BIRKETT, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Manag Sci.** v. 63, n. 7, p. 647-657, 2007.

MACHADO, V. E. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasit Vectors.** v. 8, p. 147, 2015.

MACIEL, C. et al. Evans blue as a simple method to discriminate mosquitoes' feeding choice on small laboratory animals. **PLoS One.** v. 9, n. 10, p. e110551, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Anal Bioanal Chem.** v. 406, n. 26, p. 6691-6700, 2014a.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Parasit Vectors.** v. 7, p. 60, 2014b.

MARASSÁ, A. M. et al. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 46, n. 5, p. 547-554, 2013.

MARCONDES, C. B. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 103, n. 11, p. 1093-1097, 2009.

MARCONDES, C. B. et al. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 31, n. 1, p. 51-58, 1998.

MAY-CONCHA, I. et al. Volatile compound diversity and conserved alarm behaviour in *Triatoma dimidiata*. **Parasit Vectors**. v. 8, p. 84, 2015.

MAZOMENOS, B. E. et al. Evaluation of the major female *Eurytoma amygdali* sex pheromone components, (Z,Z)-6,9-tricosadiene and (Z,Z)-6,9-pentacosadiene for male attraction in field tests. **J Chem Ecol**. v. 30, n. 6, p. 1245-1255, 2004.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigotes. **J Antimicrob Chemother**. v. 60, n. 3, p. 526-534, 2007.

MWERESA, C. K. et al. Enhancing Attraction of African Malaria Vectors to a Synthetic Odor Blend. **J Chem Ecol**. v. 42, n. 6, p. 508-516, 2016.

NEVATTE, T. M. et al. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 6104, 2017.

NGUYEN, P. L. et al. No evidence for manipulation of *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* host preference by *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 9415, 2017.

OLIVEIRA, D. M. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. **Vector Borne Zoonotic Dis**. v. 11, n. 2, p. 137-143, 2011.

OLSON, J. F. et al. Two compounds in bed bug feces are sufficient to elicit off-host aggregation by bed bugs, *Cimex lectularius*. **Pest Manag Sci**. v. 73, n. 1, p. 198-205, 2017.

OMOLO, M. O. et al. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**. v. 65, n. 20, p. 2797-2802, 2004.

OMRANI, S. M. et al. Fabrication of an olfactometer for mosquito behavioural studies. **J Vector Borne Dis**. v. 47, n. 1, p. 17-25, 2010.

OSADA, K. et al. The scent of age. **Proc Biol Sci**. v. 270, n. 1518, p. 929-933, 2003.

O'SHEA, B. et al. Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 96, n. 2, p. 117-118, 2002.

PINTO, M. C. et al. Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in the field. **J Med Entomol**. v. 48, n. 1, p. 39-44, 2011.

PINTO, M. C. et al. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. **Parasit Vectors**. v. 5, p. 210, 2012.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **Am J Trop Med Hyg**. v. 80, n. 4, p. 593-595, 2009.

PITTS, R. J. et al. The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. **Acta Trop**. v. 132, p. Suppl:S26-34, 2014.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**. v. 58, p. 227-250, 2013.

REITZ, M. et al. Analysis of chemical profiles of insect adhesion secretions by gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Chim Acta**. v. 854, p. 47-60, 2015.

RÖCK, F. et al. Comparative analysis of volatile constituents from mice and their urine. **J Chem Ecol**. v. 32, n. 6, p. 1333-1346, 2006.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. **Front Microbiol**. v. 3, p. 223, 2012.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathog**. v. 3, n. 6, p. e91, 2007.

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

SHIMABUKURO, P. H. F. et al. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys** v. 660, p. 67-106, 2017.

SHIMABUKURO, P. H. et al. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Parasit Vectors**. v. 3, p. 121, 2010.

SHIREY, R. E. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. Em: PAWLISZYN J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Elsevier. v. 4, p. 99-133, 2012.

SINGH, N. et al. Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. **J Parasitol**. v. 99, n. 1, p. 64-67, 2013.

SMALLEGANGE, R. C. et al. Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. **PLoS One**. v. 8, n. 5, p. e63602, 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **J Biochem Biophys Methods**. v. 70, n. 2, p. 235-242, 2007.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUPELCO INC. **Solid Phase Microextraction Fiber Assemblies**. 2017a. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/t794123.pdf >

SUPELCO INC. **Selection guide for Supelco SPME fibers**. 2017b. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html> >

TAVARES, D. S. Atração de vetores de leishmaniose tegumentar americana por compostos orgânicos voláteis presentes na pele humana. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 109 f.: il. 2016.

URANW, S. et al. An outbreak investigation of visceral leishmaniasis among residents of Dharan town, eastern Nepal, evidence for urban transmission of *Leishmania donovani*. **BMC Infect Dis**. v. 13, p. 21, 2013.

VACAS, S. et al. Identification of the Male-Produced Aggregation Pheromone of the Four-Spotted Coconut Weevil, *Diocalandra frumenti*. **J Agric Food Chem**. v. 65, n. 2, p. 270-275, 2016.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím Nova**. v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

WEN, P. et al. Sex-pairing pheromone of *Ancistrotermes dimorphus* (Isoptera: Macrotermitinae). **J Insect Physiol**. v. 83, p. 8-14, 2015.

WHO. **Leishmaniasis Fact sheet nº 375**. 2017 (atualizado em abril de 2017). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >.

ZARBIN, P. H. G. et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Quím Nova**. v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZAULI, R. C. et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasit Vectors**. v. 5, p. 11, 2012.

ZHANG, Z.; LI, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds **Microchem J**. v. 95, n. 2, p. 127-139, 2010.