RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 30/03/2024.

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

FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA

Avaliação da atratividade de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Araraquara, SP
2022

FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA

Avaliação da atratividade de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Tese de doutorado 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 doutora em Ciências. Área de Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Araraquara, SP

2022

Da Rocha Silva, Flávia Benini.
D224a Avaliação da atratividade de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) infectado com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) / Flávia Benini da Rocha Silva. – Araraquara: [S.n.], 2022.
111 f. : il.

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

Orientador: Mara Cristina Pinto.
Coorientador: Danilo Ciccone Miguel.

1. Leishmanioses. 2. Flebotomíneos. 3. Ecologia química. 4. Compostos orgânicos voláteis. I. Pinto, Mara Cristina. II. Miguel, Danilo Ciccone, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação da atratividade de hamster dourado (Mesocricetus auratus) infectado com Leishmania (Leishmania) amazonensis para Lutzomyia longipalpis (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 Doutora em Ciências, área de conhecimento: Parasitologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciencias Biologicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. JAIRO TORRES MAGALHÃES JUNIOR (Participaçao Virtual)
Centro Multidisciplinar do Campus de Barra / Universidade Federal do Oeste da Bahia

Profa. Dra. MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Básica / Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas UNESP Araraquara

Araraquara, 30 de março de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida (Processo n° 142092/2018-5).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida (Processo n° 88887.647854/2021-00).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da verba do projeto regular (Processo n° 2018/11419-6).

Aos meus pais, Cidinha e Marcelo, por serem sempre meu porto seguro e sempre me apoiarem.

À minha orientadora Mara, por sempre acreditar no meu potencial, por todo suporte, conselhos e amizade.

Ao meu coorientador Danilo, por toda a colaboração e suporte.

Ao professor Christiann e ao IFSP-Câmpus Matão, por tornarem viável uma etapa importante para a realização do trabalho.

À minha noiva Letícia, por todo companheirismo e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes amigos feitos no laboratório, Vicente e Thaís, por tornarem a jornada da pós-graduação mais leve, com muito companheirismo, risadas e conselhos.

Muito obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e transmitidas por insetos hematófagos denominados flebotomíneos. Clinicamente se apresentam como visceral e tegumentar. A leishmaniose visceral tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e principal vetor nas Américas os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Além disso, *Lu. longipalpis* é considerado como vetor permissivo para *L. (L.) amazonensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana. Para localização dos hospedeiros e realização do repasto sanguíneo, os insetos hematófagos utilizam compostos orgânicos voláteis (COV) liberados pelos mesmos, denominados cairomônios. Alguns estudos demonstram que hospedeiros infectados por parasitas podem liberar compostos diferentes dos não infectados e influenciar na atratividade de tais hospedeiros para os insetos hematófagos vetores. O presente estudo buscou investigar se hamsters não infectados e infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentavam diferença na atratividade para *Lu. longipalpis*; além da diferença de atratividade, buscou avaliar o volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos e os COV emitidos pelos diferentes grupos de hamsters. Complementar a isso, também foram avaliados os COV liberados *in vitro* em cultura de macrófagos infectados ou não com *L. (L.) amazonensis* e de amastigotas livres dessa espécie. A atratividade dos animais foi avaliada por meio de testes realizados em gaiolas, onde se contabiliza a taxa de alimentação das fêmeas dos flebotomíneos. As fêmeas alimentadas foram então individualizadas em microtubos, maceradas e homogeneizadas para leitura da absorbância a 540nm. Tal leitura permite estimar o volume de sangue ingerido por cada fêmea, a partir de curva padrão de absorbância *versus* volume de sangue obtida previamente. Os COV liberados pelos diferentes grupos de animais foram obtidos por meio de uma fibra de microextração em fase sólida (SPME) e analisados por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Após algumas etapas de desenvolvimento da metodologia, ficou estabelecida extração dos voláteis com uso de fibra de SPME revestida por polidimetilsiloxano/divinilbenzeno e com a amostra aquecida em banho-maria a 90°C por um período de 50 minutos. Os testes de atratividade foram realizados com um total de 10 hamsters – antes e após a infecção – onde foi possível observar uma taxa média de alimentação das fêmeas de 64,25% antes da infecção e de 64,75% após a infecção. Na avaliação do volume de sangue ingerido por fêmea, foram obtidas médias de 0,98µL e 1,10µL antes e após a infecção, respectivamente. Os voláteis extraídos a partir de amostras de pelos dos animais utilizados nos testes de atratividade e das culturas *in vitro* foram identificados com auxílio de biblioteca de espectros e cálculo dos índices de retenção. Os COV identificados foram submetidos à análise de componentes principais para verificar possíveis correlações com os animais e o status da infecção. A partir dos resultados obtidos para os testes *in vivo*, não foi possível observar uma influência da infecção por *L. (L.) amazonensis* na taxa de alimentação das fêmeas de *Lu. longipalpis* em hamsters e no perfil de COV liberados por esses animais. Para os COV identificados a partir dos testes *in vitro* com culturas infectadas com *L. (L.) amazonensis*, foi possível observar a presença de undecan-2-ona exclusivamente nas formas amastigotas-like livres; octan-1-ol e 2-feniletanol nas formas amastigotas (independente da maneira de obtenção); e de 4-fenilciclohexeno em todas as amostras, porém em maior teor nas amastigotas livres de lesão. Tais compostos podem ser estudados futuramente quanto à sua atratividade para flebotomíneos.

Palavras-chave: leishmanioses; flebotomíneos; ecologia química; compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonosis caused by flagellated protozoa of *Leishmania* genus, transmitted by hematophagous insects called sand flies, and present two main clinical manifestations: visceral and cutaneous. Visceral leishmaniasis has as *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* as aetiological agent and *Lutzomyia longipalpis* sand flies as main vector in the America. Furthermore, *Lu. longipalpis* is considered as a permissive vector to *L. (L.) amazonensis*, one of aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis. To ensure a successful *Leishmania* transmission, the female sand fly needs to detect a vertebrate host for blood meal. For this, sand flies females and other haematophagous insects use some chemical cues called kairomones, which are volatiles organic compounds (VOCs) released by the hosts. Some studies have demonstrated that parasites-infected hosts can release different compounds when compared to uninfected, presenting a higher attractiveness to haematophagous vectors. In the present study, we evaluated possible differences on the attractiveness of golden hamsters uninfected versus *L. (L.) amazonensis*-infected to *Lu. longipalpis* females and the blood volume ingested by the sand flies females fed on those animals; also, we investigated the VOCs released by the animals before and after infection with *L. (L.) amazonensis*. Additionally, we evaluate possible differences in the VOCs released by host macrophages, uninfected or infected by *L. amazonensis*, and by free amastigotes in culture medium. Hamsters' attractiveness trials were performed in Barraud cages, by counting of the number of blood fed sand flies females, which after each trial were individualized in microtubes, macerated and homogenized for absorbance reading at 540nm. Such reading allows estimating the blood volume ingested by each sand fly female, by using a standard curve of absorbance versus blood volume previously obtained. VOCs realeased by the different groups of animals were obtained by a solid phase microextraction fiber and analysed by gas chromatography-linked mass spectrometry. After some development steps, we established the VOCs extraction conditions: SPME fiber coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene, with the sample heated at 90°C for 50 minutes. Attractiveness trials were performed with a total of 10 hamsters – before and after infection – and we could observer means of blood fed females of 64.25% before the infection and 64.75% after the infection. For the blood volume ingested by sand fly female, we obtain means of 0.98µL and 1.10µL before and after the infection, respectively. VOCs extracted from animals samples and from *in vitro* cultures were identified by comparing mass spectra to the library of the machine and by comparing the retention indexes to those of a mixture of C8-C20 n-alkanes. Identified VOCs were subjected to principal components analysis to verify possible correlations with animals and status of infection. The results obtained from the *in vivo* trials did not showed a possible influence of *L. (L.) amazonensis* infection on the blood meal rates of *Lu. longipalpis* in hamsters and on the VOCs profiles released by these animals. For the VOCs identified from *in vitro L. (L.) amazonensis*-infected cell cultures, it was possible to observe the presence of undecan-2-one exclusively in amastigote-like cells; octan-1-ol and 2-phenylethanol in amastigote forms (independently of the obtained method); and 4-phenycyclohexene in all of the samples, but with large amount in amastigotes from lesion site. Such compounds can be future evaluated for their attractiveness for sand flies.

Keywords: leishmaniasis; sand flies; chemical ecology; volatile organic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida e transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania*. (a) fêmeas de flebotomíneos adquire as formas amastigotas da *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado; (b) amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas no intestino do inseto e após desenvolvimento completo se diferenciam em promastigotas metacíclicas; (c) promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do inseto e são inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado no momento de um novo repasto sanguíneo; (d) promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e voltam a se diferenciar em amastigotas; (e) as amastigotas se multiplicam intracelularmente e, após apoptose da célula infectada, infectam novas células do hospedeiro; (f) as formas amastigotas são adquiridas pelo vetor durante um novo repasto sanguíneo, continuando assim o ciclo de transmissão. 14

Figura 2. Estruturas moleculares dos feromônio sexuais produzidos pelas diferentes populações de *Lu. longipalpis*. (a) (*S*)-9-metilgermacreno-B; (b) 3-metil-α-himachaleno; (c) sobraleno, sendo dois homosesquiterpenos e um diterpeno, respectivamente. 16

Figura 3. Nomenclatura dos semioquímicos de acordo com o tipo de interação mediada. Aleloquímicos são classificados de acordo com o benefício para o organismo emissor e para o receptor. Feromônios são classificados de acordo com a função exercida. 17

Figura 4. Estrutura molecular dos compostos identificados como potenciais biomarcadores de infecção de cães por *L. (L.) i. chagasi*. (a) octanal; (b) nonanal; (c) β-hidroxietil fenil éter; (d) decanal; (e) heptadecano; (f) 2-etil-hexil salicilato. 19

Figura 5. Fluxograma geral das etapas realizadas durante a execução experimental do estudo. (a) delineamento dos testes realizados a partir de infecção *in vivo*; (b) delineamento dos testes realizados a partir de infecção *in vitro*..... 24

Figura 6. (a) Gaiola de Barraud utilizada nos testes de alimentação das fêmeas de flebotomíneos; (b) fêmeas de *Lu. longipalpis* se alimentando em pata de hamster utilizado no teste. 26

Figura 7. Fêmeas de *Lu. longipalpis* com diferentes níveis de ingestão sanguínea. (a) parcialmente ingurgitada; (b) totalmente ingurgitada. 27

Figura 8. Fluxograma dos testes de alimentação realizados com os hamsters não infectados e infectados com *L. (L.) amazonensis* para *Lu. longipalpis*. Intervalo entre t0 e t1 foi de aproximadamente 30-40 dias e assim sucessivamente entre os demais tempos..... 27

Figura 9. Esquema geral de metodologia utilizada para avaliação do volume de sangue ingerido pelas fêmeas nos testes de atratividade. 28

Figura 10. *Vials* utilizados para acondicionamento das amostras durante as extrações, com fibra de SPME inserida para adsorção dos voláteis. 29
Figura 11. Imagens representativas do procedimento usado para a extração de voláteis produzidos por macrófagos infectados ou não com *L. (L.) amazonensis* (cepa PH8). 32
Figura 12. Dados gerais dos animais após a infecção por *L. (L.) amazonensis*. (a) tamanho das patas infectadas e não infectadas após infecção; (b) tamanho da lesão das patas infectadas; (c) peso dos animais após infecção. p.d.: pata direita (não infectada); p.e.: pata esquerda (infectada). 35
Figura 13. Volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos em cada um dos hamsters nos testes de atratividade por meio de alimentação direta das fêmeas de flebotomíneos (n=30/cada condição testada). NI: não infectado; PI: pós-infecção. n.s. = não significativo. 37
Figura 14. Número de picos totais e área total dos picos obtidos a partir de amostras de pelos de hamster para os diferentes revestimentos testados das fibras de SPME. DVB: divinilbenzeno; CAR: Carboxen®; PDMS: polidimetilsiloxano; PA: poliacrilato. 38
Figura 15. Cromatograma obtido nas condições testadas a partir da extração utilizando fibra de SPME revestida por PDMS/DVB. (a) cromatograma total; (b) zoom t_R=45-72 minutos. .. 39
Figura 16. Número de picos totais e área total dos picos obtidos para cada uma das condições de temperatura/tempo de extração testadas. 40
Figura 17. Cromatograma obtido para as melhores condições de temperatura/tempo de extração testadas (90°C por 50 minutos). (a) Cromatograma total; (b) zoom t_R=20-55 minutos; (c) zoom t_R=55-93 minutos. 41
Figura 18. Cromatograma obtido após modificações no programa de temperatura da coluna cromatográfica. (a) Cromatograma total; (b) zoom t_R=9-36 minutos; (c) zoom t_R=36-59 minutos. 42
Figura 19. Número de picos totais obtidos para os hamsters que tiveram a atratividade testada para a *Lu. longipalpis* . NI: não infectado; PI: pós-infecção. 43
Figura 20. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis identificados a partir das amostras de pelos de hamsters não infectados e infectados com *L. (L.) amazonensis*. (a) F1 x F2; (b) F2 x F3. Os números representam os COV identificados, de acordo com a tabela 2. NI: não infectado; PI: pós-infecção. 48
Figura 21. Análise de *cluster* para verificação da proximidade dos hamsters que foram utilizados para os testes de atratividade e que tiveram seus VOC extraídos e identificados. Os números representam os COV identificados, de acordo com a Tabela 2. 49

Figura 22. Infecção *in vitro* com *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. (a) porcentagem total de células infectadas (média de cinco poços); (b) Número de parasitos para 100 macrófagos (média de cinco poços). 52
Figura 23. Imagens representativas das culturas de macrófagos. (a) não infectados; (b) infectados com *L. (L.) amazonensis* cepa PH8. Setas indicam amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos após 48h. Barra = 10 µm. 52
Figura 24. Imagens representativas de lâminas de esfregaço da cultura de amastigotas coradas com panótico. Barra = 10 µm. 53
Figura 25. Comparativo dos perfis cromatográficos obtidos a partir da extração dos voláteis de cultura de macrófagos não infectados com fibra de SPME (preto) e polímero Tenax TA (vermelho). 54
Figura 26. Perfis cromatográficos obtidos por meio de extração com fibra de SPME (PDMS/DVB) de culturas de: (a) meio de cultura (preto), macrófagos não infectados (verde) e infectados com *L. (L.) amazonensis* (vermelho); (b) meio de cultura (preto), amastigotas-*like* livres (laranja) e amastigotas de lesão livres (azul). 54
Figura 27. Número de picos totais obtidos por meio de extração com fibra de SPME (PDMS/DVB) para as amostras *in vitro* analisadas..... 55
Figura 28. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis identificados a partir das amostras obtidas *in vitro*. (a) F1 x F2; (b) F2 x F3. Os números representam os compostos identificados, de acordo com a tabela 3..... 58
Figura 29. Análise de cluster dos compostos voláteis identificados a partir das amostras *in vitro*, com separação em dois principais agrupamentos (1 e 2), sendo o primeiro agrupamento o de compostos voláteis correlacionados as amastigotas livres (azul) e segundo aos macrófagos, independente de estar infectado ou não (vermelho). 59
Figura 30. COV identificado exclusivamente em apenas uma das amostras de culturas de células infectadas com *L. (L.) amazonensis*: amastigotas-*like* livres. (a) comparativo dos cromatogramas das diferentes amostras; (b) fórmula estrutural da undecan-2-ona. Seta indica o pico referente à undecan-2-ona (t_R=25,490). Cromatogramas: meio de cultura (preto); macrófagos (verde); macrófagos infectados (vermelho); amastigotas-*like* livres (laranja); e amastigotas de lesão livres (azul). 60
Figura 31. COV identificado exclusivamente em um grupo de amostras de culturas de células infectadas com L. (L.) amazonensis: amastigotas livres. (a) e (c) comparativo dos cromatogramas das diferentes amostras; (b) fórmula estrutural do octan-1-ol; (d) fórmula estrutural do 2-feniletanol. Setas indicam os picos referentes ao octan-1-ol (t_R=17,002) e ao 2-

feniletanol (t_R=18,784). Cromatogramas: meio de cultura (preto); macrófagos (verde); macrófagos infectados (vermelho); amastigotas-*like* livres (laranja); e amastigotas de lesão livres (azul). 61
Figura 32. COV identificado em todas as amostras de culturas de células, porém em maior teor na amostra de amastigotas livres de lesão. (a) comparativo dos cromatogramas das diferentes amostras; (b) fórmula estrutural do 4-fenilciclohexeno. Seta indica o pico referente ao 4-fenilciclohexeno (t_R=27,021). Cromatogramas: meio de cultura (preto); macrófagos (verde); macrófagos infectados (vermelho); amastigotas-*like* livres (laranja); e amastigotas de lesão livres (azul). 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos hamsters (antes e após a infecção) nos testes de atratividade por meio de alimentação direta das fêmeas de flebotomíneos (n = 40/hamster; n_{TOTAL} = 400 para cada condição testada). p=0,9341. 36

Tabela 2. Compostos identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (t_R) e com seus respectivos índices de retenção (IR) calculados e obtidos a partir das bases de dados. Valores indicam a área relativa do composto na amostra; -: indica ausência do composto na amostra. NI: não infectado; PI: pós-infecção. 44

Tabela 3. Compostos identificados nas amostras de pelos de hamsters que já foram previamente identificados em outros estudos com diferentes hospedeiros vertebrados. 47

Tabela 4. Compostos tentativamente identificados a partir das amostras in vitro, em ordem crescente de tempo de retenção (t_R) e com seus respectivos índices de retenção (IR) calculados e obtidos a partir das bases de dados. Valores indicam a área relativa do composto na amostra; valores destacados em negrito indicam composto presente em uma amostra ou grupo de amostras; -: indica ausência do composto na amostra. 56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 Leishmanioses e flebotomíneos 13

1.2 Cairomônios e infecções por parasitas 17

1.3 Extração e identificação de cairomônios 20

2 JUSTIFICATIVA 22

3 OBJETIVOS 23

3.1 Objetivo geral 23

3.2 Objetivos específicos 23

4 MATERIAL E MÉTODOS 24

4.1 Flebotomíneos 24

4.2 Infecção dos hamsters 25

4.3 Avaliação da taxa de alimentação 25

4.4 Avaliação do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos 28

4.5 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais 29

4.5.1 Padronização fibra SPME 30

4.5.2 Padronização temperatura/tempo de extração 30

4.5.3 Extração e identificação dos voláteis 31

4.6 Infecção e análise de voláteis *in vitro* 32

4.6.1 Cultura de macrófagos 32

4.6.2 Amastigotas livres 33

4.6.3 Análise dos voláteis 33

4.7 Análise dos dados 34

4.8 Ética 34

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

5.1 Infecção dos hamsters 35

5.2 Avaliação da taxa de alimentação 36

5.3 Avaliação do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos 37

5.4 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais 38

5.4.1 Padronização fibra SPME 38

5.4.2 Padronização temperatura/tempo de extração 40

5.4.3 Extração e identificação dos voláteis 41

5.5 Infecção e análise de voláteis *in vitro* 52

5.5.1 Cultura de macrófagos 52
5.5.2 Amastigotas livres 53
5.5.3 Análise dos voláteis 53
6 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS 64
APÊNDICES 70
APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAr. 70
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos a partir de amostra de pelos de hamster sadio para os diferentes tipos de revestimentos testados em etapa de seleção da fibra de SPME. Cinza: DVB/CAR/PDMS; rosa: PDMS/DVB; azul: CAR/PDMS; preto: PA. 71
APÊNDICE C – Cromatogramas obtidos a partir de amostra de pelos de hamster sadio para as diferentes condições testadas em etapa de seleção de tempo e temperatura de extração dos compostos voláteis. (a) 50°C; (b) 70°C; (c) 90°C. Em cada imagem, de cima para baixo: 10, 30 e 50 minutos. 72
APÊNDICE D – Cromatogramas obtidos a partir da análise dos compostos voláteis presentes em amostras de pelos dos hamsters utilizados nos testes de atratividade para *Lu. longipalpis*. (a) H1; (b) H2; (c) H3; (d) H4; (e) H5; (f) H6; (g) H7; (h) H8; (i) H9; (j) H10. Preto: não infectado; vermelho: pós-infecção 73
APÊNDICE E - Estruturas moleculares dos compostos voláteis identificados e comparação dos espectros de massas dos compostos presentes nas amostras de pelos dos hamsters (superiores) com as bibliotecas utilizadas (inferiores). Porcentagens indicam o grau de similaridade dos compostos. 76
APÊNDICE F – Cromatogramas obtidos a partir da análise dos compostos voláteis extraídos de culturas *in vitro* de *Leishmania* spp. (a) meio de cultura; (b) macrófagos; (c) macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; (d) amastigotas-*like* livres de *L. (L.) amazonensis*; (e) amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*. 95
APÊNDICE G - Estruturas moleculares dos compostos voláteis identificados e comparação dos espectros de massas dos compostos presentes nas amostras das culturas de células (superiores) com as bibliotecas utilizadas (inferiores). Porcentagens indicam o grau de similaridade dos compostos. 97

1 INTRODUÇÃO

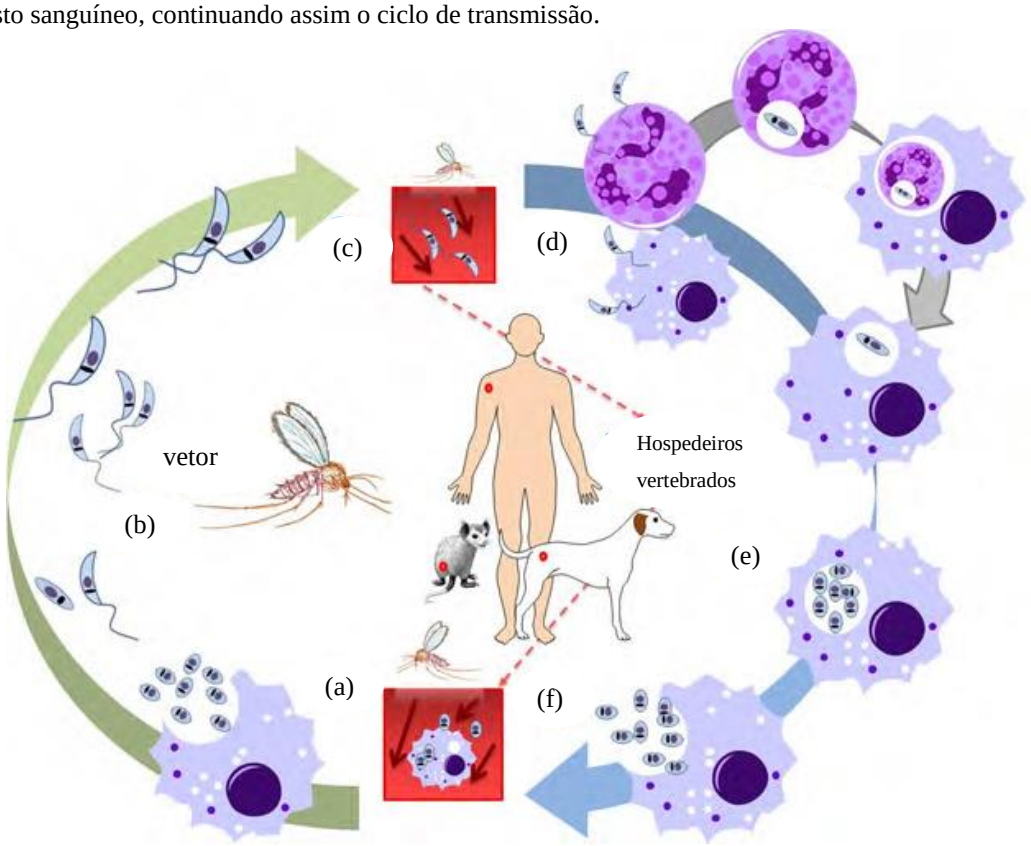
1.1 Leishmanioses e flebotomíneos

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), dividido em quatro subgêneros: *Leishmania* Saf'Janova, 1982, *Viannia* Lainson & Shaw, 1987, *Sauroleishmania* Ranque, 1973 e *Mundinia* Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 (ESPINOSA et al., 2016; WHO, 2017). 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).

Embora tais protozoários sejam capazes de infectar e causar manifestações patológicas relevantes para o ser humano, o mesmo é considerado um hospedeiro acidental, uma vez que não apresenta importância para a manutenção do ciclo do parasita na natureza (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* e desenvolvimento completo de suas formas ocorrem em um hospedeiro vertebrado e um inseto hematófago responsável pela vetorização dos parasitas. Dentro de tal ciclo, a *Leishmania* apresenta duas principais formas: as amastigotas, que não possuem flagelo e são as formas infectantes para o vetor; e as promastigotas metacíclicas, que são flageladas e infectantes para os hospedeiros vertebrados (Figura 1) (PAHO, 2020).

Figura 1. Ciclo de vida e transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania*. (a) fêmeas de flebotomíneos adquire as formas amastigotas da *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado; (b) amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas no intestino do inseto e após desenvolvimento completo se diferenciam em promastigotas metacíclicas; (c) promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do inseto e são inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado no momento de um novo repasto sanguíneo; (d) promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e voltam a se diferenciar em amastigotas; (e) as amastigotas se multiplicam intracelularmente e, após apoptose da célula infectada, infectam novas células do hospedeiro; (f) as formas amastigotas são adquiridas pelo vetor durante um novo repasto sanguíneo, continuando assim o ciclo de transmissão.



Adaptado de: PAHO. Interactive Atlas of Leishmaniasis in the Americas: clinical aspects and differential diagnosis. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 2020.

Endêmicas em 98 países e amplamente distribuídas mundialmente, as leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas e estima-se cerca de um bilhão de pessoas vivendo em áreas com risco de transmissão (WHO, 2020). Clinicamente, as leishmanioses se apresentam como: visceral e tegumentar.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode ser manifestada 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, 2017). Já a leishmaniose visceral (LV) atinge principalmente tecidos do fígado, baço e medula óssea, podendo ser fatal em 95% dos casos se o diagnóstico e tratamento não forem feitos de maneira precoce (WHO, 2017).

No Brasil, observou-se um aumento no número de casos de LTA registrados a partir da década de 80, 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*, seguida pela *L. (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2017). Dentre tais espécies de *Leishmania*, a *L. (L.) amazonensis* é a principal responsável pela manifestação cutâneo difusa da LTA, geralmente associada à paciente com deficiência da resposta imune (CONVIT; ULRICH, 1993).

A LV, que tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) infantum*, apresenta casos autóctones em 24 dos 27 estados do país (BRASIL, 2021a). No período entre 1990 e 2020 foram registrados 753.656 casos de LTA e 95.547 casos de LV, sendo 16.432 e 1.933 casos de LTA e LV no ano de 2020, respectivamente (BRASIL, 2021b, 2021a).

As leishmanioses são transmitidas por insetos hematófagos denominados flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), popularmente conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2017). 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 (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Atualmente, dentre quase 1.000 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, 530 ocorrem nas Américas e aproximadamente 20 espécies são consideradas como vetores das leishmanioses no Novo Mundo (BRAZIL; RODRIGUES; FILHO, 2015; SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017).

Para uma espécie de flebotomíneo ser considerada vetora, alguns critérios devem ser atendidos como, por exemplo, apresentar infecção natural por *Leishmania* spp e estar presente altas densidades em área de transmissão (READY, 2013).

A LV tem como principal vetor flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que está distribuída amplamente pelo Brasil (BRASIL, 2014). No estado de São Paulo, pode ser encontrado em 196 municípios, dos quais aproximadamente 77% apresentam transmissão de LV (HIRAMOTO et al., 2019).

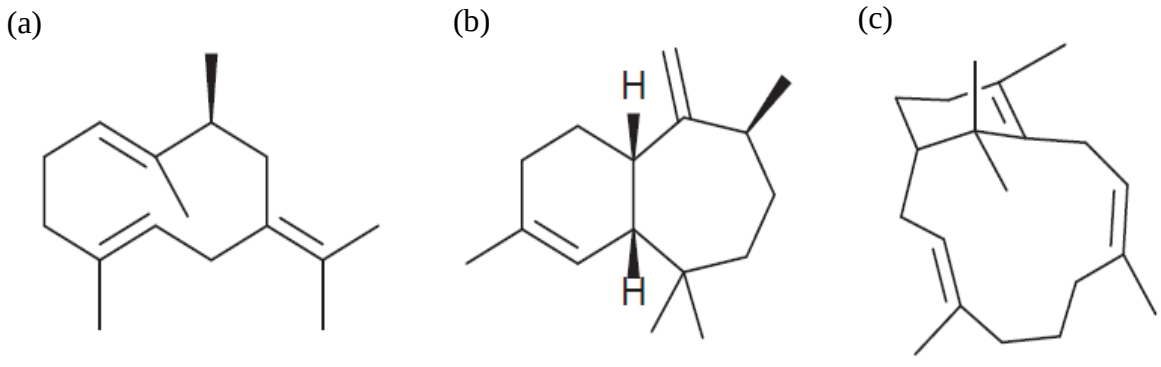
Apesar de ter o papel de principal vetor do agente etiológico da LV, *Lu. longipalpis* também é considerado um vetor permissivo da *L. (L.) amazonensis*, um dos agentes etiológicos da LTA (MOLYNEUX; KILLICK KENDRICK; ASHFORD, 1975; SILVA et al.,

1990). A *L. (L.) amazonensis* tem como principal vetor flebotomíneos da espécie *Bychromomyia flaviscutellata* (LAINSON; SHAW, 1968; RANGEL; LAINSON, 2009). No entanto, por se tratar de uma espécie com uma baixa antropofilia, possui maior importância na transmissão zoonótica da LTA (BRILHANTE et al., 2015). Além disso, *Lu. longipalpis* pode ser encontrado como espécie predominante em regiões urbanas endêmicas para as leishmanioses, onde é possível identificar a presença de DNA de *L. (L.) amazonensis* em cerca de 40% dos espécimes coletados (CARVALHO-SILVA et al., 2022). Ainda, *Lu. longipalpis* também já foi capaz de transmitir *L. (L.) amazonensis* experimentalmente para camundongos, resultando em manifestação clínica da LTA nos animais (DA SILVA et al., 2021).

Levando em conta a maior importância de *Bi. flaviscutellata* na transmissão zoonótica da LTA, a presença de *Lu. longipalpis* em regiões onde ocorre a transmissão de *L. (L.) amazonensis* e sua capacidade de transmitir experimentalmente essa espécie de *Leishmania*, cabe ressaltar a relevância de se investigar os diferentes aspectos envolvidos no papel de *Lu. longipalpis* como vetor permissivo dessa espécie (BRILHANTE et al., 2015; CARVALHO et al., 2018).

De forma geral, *Lu. longipalpis* é considerado como um complexo de espécies, uma vez que dentro da mesma espécie existem diferentes populações. As populações apresentam diversas características diferentes, no entanto são divididas de acordo com o feromônio sexual produzido por cada uma delas: (*S*)-9-metilgermacreno-B (9-MGB), 3-metil-*α*-himachaleno (3-M*α*H) e biciclo[9.3.1]pentadeca-*E*-3,4-*Z*-8,9-trieno (sobraleno – SOBR), sendo que este último anteriormente era considerado como uma dupla de isômeros denominados cembreno-1 e cembreno-2 (Figura 2) (HAMILTON et al., 2005; PALFRAMAN et al., 2018).

Figura 2. Estruturas moleculares dos feromônio sexuais produzidos pelas diferentes populações de *Lu. longipalpis*. (a) (*S*)-9-metilgermacreno-B; (b) 3-metil-*α*-himachaleno; (c) sobraleno, sendo dois homosesquiterpenos e um diterpeno, respectivamente.

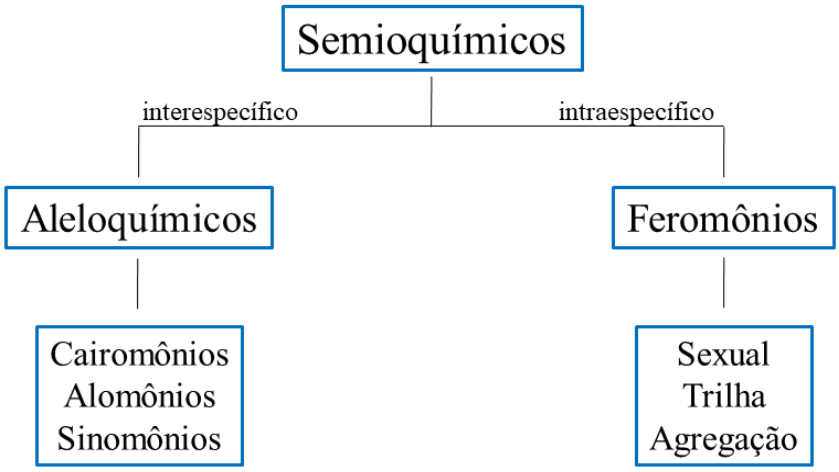


Fonte: PALFRAMAN, M. J. et al. Sobralene, a new sex-aggregation pheromone and likely shunt metabolite of the taxadiene synthase cascade, produced by a member of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* species complex. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 20, p. 1921–1923, 2018.

No estado de São Paulo são encontradas duas das diferentes populações de *Lu. longipalpis* (9-MGB e SOBR) (CASANOVA et al., 2006). A presença de tais populações em áreas com diferenças epidemiológicas da LV sugere que elas apresentem uma diferença na capacidade vetorial de *L. (L.) infantum* (CASANOVA et al., 2015).

Os feromônios são compostos orgânicos voláteis (COV) responsáveis pela mediação de interações intraespecíficas, sendo considerados como semioquímicos. Além dos feromônios, que podem apresentar diferentes funções, existem também os aleloquímicos, que desencadeiam interações interespecíficas. Tais interações mediadas por semioquímicos, sejam elas intra ou interespecíficas, são objetos de estudo da ecologia química (Figura 3) (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Figura 3. Nomenclatura dos semioquímicos de acordo com o tipo de interação mediada. Aleloquímicos são classificados de acordo com o benefício para o organismo emissor e para o receptor. Feromônios são classificados de acordo com a função exercida.



Adaptado de: ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

Dentre os aleloquímicos, os cairomônios são COV 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 (BRAY; WARD; HAMILTON, 2009).

1.2 Cairomônios e infecções por parasitas

O conhecimento dos cairomônios pode ser aplicado no monitoramento e/ou controle desses insetos por meio de iscas atrativas, principalmente em áreas endêmicas da doença onde estão presentes os vetores em menor 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.

Alguns estudos têm mostrado que hospedeiros infectados por parasitas podem liberar compostos diferentes daqueles não infectados, influenciando assim na atratividade dos insetos hematófagos por tais hospedeiros. Diferentes espécies de culicídeos transmissores da malária apresentaram uma maior atratividade por hospedeiros contaminados com *Plasmodium* spp (BATISTA; COSTA; SILVA, 2014; CORNET et al., 2013; DE MORAES et al., 2014; DÍEZ-FERNÁNDEZ et al., 2020; LACROIX et al., 2005).

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 dos insetos por esses hospedeiros (BATISTA; COSTA; SILVA, 2014; DE MORAES et al., 2014; LACROIX et al., 2005). Foi também demonstrado que diferentes cepas de parasitas podem desencadear respostas distintas na atratividade, como é o caso do *Plasmodium falciparum*, onde culicídeos infectados por uma cepa sensível à cloroquina apresentaram uma maior atratividade aos odores humanos de voluntários saudáveis (SMALLEGANGE et al., 2013) e culicídeos infectados por uma cepa isolada de pacientes infectados no Marrocos não apresentaram diferença na atratividade (NGUYEN et al., 2017).

Para flebotomíneos, existem evidências de que diferentes espécies de *Leishmania* possam manipular a quantidade de sangue ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos insetos, aumentando a taxa de transmissão (ROGERS, 2012; ROGERS; BATES, 2007).

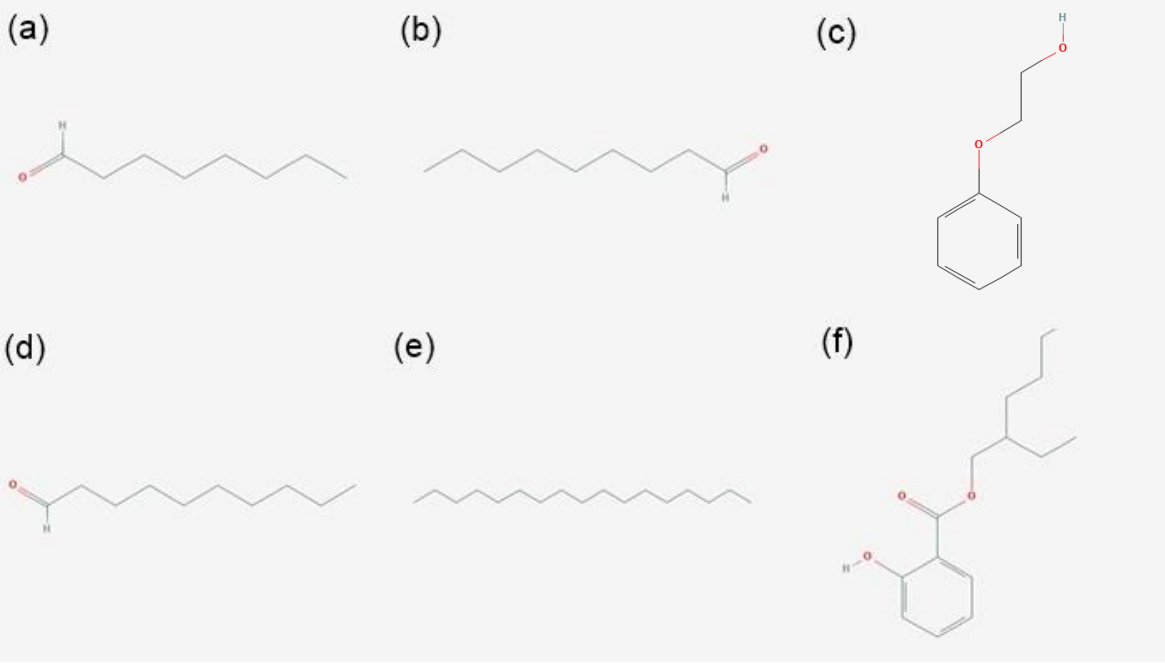
Ao avaliar a resposta de *Lu. longipalpis* frente a hospedeiros infectados ou não por *L. (L.) i. chagasi*, sugere-se que a maior atratividade do inseto pelo hospedeiro contaminado ocorra devido a uma alteração dos odores do hospedeiro mediada pelo parasita (O'SHEA et al., 2002), porém não foram identificados os compostos que poderiam estar envolvidos nessa maior atratividade.

Em outro estudo, foi avaliada a atratividade de *Lu. longipalpis* frente aos odores extraídos de hamsters antes da infecção e após um período de latência de infecção por *L. (L.) i. 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 por hospedeiros infectados (NEVATTE et al., 2017). Esse estudo também não identificou os voláteis envolvidos.

Quando avaliados os compostos voláteis presentes em amostras de pelos de cães infectados (assintomáticos e sintomáticos) ou não por *L. (L.) i. chagasi*, foram identificados 10 compostos presentes em maior quantidade no grupo de cães infectados, dos quais seis compostos – octanal, nonanal, *β*-hidroxietil fenil éter, decanal, heptadecano e 2-etil-hexil salicilato (Figura 4) – podem ser considerados como potenciais biomarcadores de infecção pelo parasita, tanto em infecções assintomáticas quanto em infecções sintomáticas (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a).

Figura 4. Estrutura molecular dos compostos identificados como potenciais biomarcadores de infecção de cães por *L. (L.) i. chagasi*. (a) octanal; (b) nonanal; (c) *β*-hidroxietil fenil éter; (d) decanal; (e) heptadecano; (f) 2-etil-hexil salicilato.



Fonte: Pubchem.

Tais compostos identificados como biomarcadores acima citados foram testados quanto à sua atratividade individualmente – em concentrações de 50 e 100% – para machos e fêmeas e em diferentes misturas entre eles para machos de *Lu. longipalpis*. Dentre os compostos individuais, nonanal (50%) e decanal (50 e 100%) apresentaram resposta considerável de ativação para fêmeas e octanal (50 e 100%), nonanal (100%), decanal (50 e 100%) e heptadecano (100%) apresentaram resposta considerável de ativação para machos. Quanto às misturas testadas para os machos, octanal:decanal (1:1) apresentou resposta

significativa de ativação e octanal:decanal:heptadecano (1:1:1) apresentou resposta significativa de ativação e atração (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2019).

Ainda considerando cães infectados ou não por *L. (L.) i. chagasi*, com o auxílio de um sensor para análise dos COV provenientes de amostras de pelos e confirmação da infecção por PCR, foi possível distinguir os animais infectados dos animais sadios com boa especificidade e boa sensibilidade, até mesmo para os cães com baixa parasitemia (STANIEK et al., 2019). Quando testada a atratividade dos COV provenientes de tais amostras, foi possível observar uma maior atratividade dos odores de cães infectados para fêmeas de *Lu. longipalpis* (STANIEK; HAMILTON, 2021).

Com relação à *L. (V.) braziliensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar, e seu vetor *Ny. neivai*, não foi possível observar diferenças na atratividade e nos voláteis emitidos por camundongos BALB/c infectados ou não, assim como não houve diferença entre os voláteis produzidos pelos dois grupos de animais (DA ROCHA SILVA et al., 2019).

1.3 Extração e identificação de cairomônios

Além do desenvolvimento de melhores iscas atrativas para insetos vetores, a padronização da extração e da identificação dos COV liberados por hospedeiros vertebrados também pode levar a possíveis biomarcadores de infecção que podem ser considerados como ferramentas de diagnóstico. No caso da malária, a análise de COV respiratórios de indivíduos infectados com *P. falciparum* reportou inicialmente um grupo de quatro compostos da classe dos tioéteres presentes em diferentes concentrações quando comparado com indivíduos saudáveis (BERNA et al., 2015; IVAN et al., 2021). No entanto, um grupo de terpenos liberados na respiração mostrou um aumento ao longo do curso da infecção, podendo ser considerados como possíveis biomarcadores para a predição da infecção por *P. vivax* e *P. falciparum* com uma acurácia de até 91 e 93,5%, respectivamente (BERNA et al., 2018).

Por mais que os COV provenientes da respiração dos hospedeiros vertebrados sejam considerados como uma parte importante para a atração dos insetos, a identificação dos voláteis liberados pela pele também pode ser considerada como peça chave na interação vetor-hospedeiro. O uso da técnica de microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* – SPME) para extração dos COV a partir de amostras de pelos se mostrou como uma ferramenta interessante para a avaliação de odores da pele de hospedeiros (TAVARES et al., 2019). 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), para posterior separação e identificação dos analitos (ZHANG; LI, 2010).

A técnica de SPME é realizada por meio de uma fibra de sílica revestida por um polímero, protegida por um tubo hipodérmico e presa a um êmbolo. O polímero pelo qual a fibra é revestida 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).

As fibras de SPME disponíveis comercialmente podem apresentar diferentes tipos de revestimentos da fibra de sílica, cada um com diferentes características (SHIREY, 2012; SUPELCO, 2018a). 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, 2018b).

Com a expansão do uso da técnica de SPME, puderam 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 (DORMONT et al., 2013; DORMONT; BESSIÈRE; COHUET, 2013; GALLAGHER et al., 2008; TAVARES et al., 2019).

Para outros insetos hematófagos, a SPME já foi utilizada para a identificação de compostos liberados em situações de alarme pelas glândulas de *Triatoma infestans* (GONZÁLEZ AUDINO et al., 2007) e de *Triatoma dimidiata* (MAY-CONCHA et al., 2015). Além disso, também foram identificados compostos nas fezes de *Cimex lectularius* e seu efeito negativo no comportamento de agregação desses insetos (OLSON et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Como salientado anteriormente, para culicídeos, transmissores do agente etiológico da malária, os dados de literatura apontam para uma maior atratividade dos hospedeiros infectados com determinadas cepas de *Plasmodium* spp, além de uma diferença no perfil de voláteis liberados por tais hospedeiros quando comparado com hospedeiros não infectados.

Para os flebotomíneos e *Leishmania* spp, seis artigos tratam desse assunto. Cinco deles foram realizados com *L. (L.) infantum* e *Lu. longipalpis*, sendo três com estudos comportamentais, indicando aumento da atratividade de flebotomíneos para animais infectados (NEVATTE et al., 2017; O'SHEA et al., 2002; STANIEK; HAMILTON, 2021); um com análise cromatográfica de voláteis de pelos de animais infectados e não infectados, que identificou um determinado grupo de biomarcadores de infecção (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014) e um que utiliza um sensor capaz de diferenciar cães infectados de cães sadios a partir dos voláteis extraídos de amostras de pelos dos animais (STANIEK et al., 2019). No único estudo com *L. (V.) braziliensis*, não houve indicação de diferença comportamental na atratividade para *Ny. neivai* (DA ROCHA SILVA et al., 2019).

Esses resultados deixam uma pergunta, será que somente a *L. (L.) infantum*, causadora da leishmaniose visceral, pode causar alteração na atratividade para o vetor, sendo que o mesmo não se observou para a espécie, *L. (V.) braziliensis*, causadora da leishmaniose tegumentar? Além disso, a infeção por espécies de *Leishmania* causadoras da LTA é capaz de alterar o perfil dos COV liberados pelos hospedeiros?

O presente projeto foi idealizado para investigar essa questão utilizando o modelo de outra espécie causadora de leishmaniose tegumentar, *L. (L.) amazonensis.* Como modelo de flebotomíneo, foi utilizada a espécie *Lu. longipalpis*, considerada permissiva para essa espécie de *Leishmania*.

Tendo em vista também estudos anteriores realizados com culturas celulares de glóbulos vermelhos infectados com *P. falciparum*, onde se verificou a presença de alguns COV liberados exclusivamente pelas culturas infectadas, levantou-se a questão se a cepa de *L. (L.) amazonensis* utilizada no presente estudo seria capaz de alterar o perfil de COV liberados por culturas de células infectadas por ela.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis diferenças de atratividade de hamsters não infectados e infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a quantidade de sangue ingerida pelos flebotomíneos alimentados em hamsters não infectados e infectados.
- ✓ Identificar os COV emitidos pelos hamsters não infectados e infectados.
- ✓ Analisar os COV emitidos em cultura de macrófagos infectados ou não com *L. (L.) amazonensis* e de amastigotas livres dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos testes realizados nas gaiolas, não foi possível observar diferença significativa nas taxas de alimentação das fêmeas de *Lu. longipalpis* em hamsters não infectados e infectados com *L. (L.) amazonensis*.

As diferenças no número de picos totais obtidos para a extração de COV dos hamsters não infectados e após a infecção ressaltam a variação interindividual como um fator importante para a atratividade.

A identificação dos COV dos animais não permitiu nenhuma distinção do grupo de animais infectados quando comparados com os mesmo animais previamente à infecção com *L. (L.) amazonensis*.

Quando analisados os COV a partir de infecção in vitro com *L. (L.) amazonensis*, não foram observadas diferenças significativas no número total de compostos obtidos. No entanto, foi possível observar alguns COV presentes exclusivamente em algumas das amostras.

A presença de determinados compostos em apenas culturas de células infectadas com *L. (L.) amazonensis*, assim como o já observado para a malária, os COV extraídos de infecções *in vitro* podem ser considerados como um bom direcionamento dos compostos voláteis que podem vir a serem produzidos também por hospedeiros infectados. Dessa maneira, a identificação desses voláteis pode ser interessante para a avaliação da atratividade de tais compostos para flebotomíneos.

O significado biológico dos resultados obtidos precisa ser mais profundamente estudados com outros agentes etiológicos das LTs para um panorama mais geral do processo de atratividade, pois até momento os dados apontam que a diferença de atratividade e/ou na produção dos COV observada em LV não ocorre em LT.

REFERÊNCIAS

ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ANCHIETA, N. F. **Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos por cultura de células e animais infectados com *Leishmania infantum***. [s.l.] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

BATISTA, E. P.; COSTA, E. F.; SILVA, A. A. *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) displays increased attractiveness to infected individuals with *Plasmodium vivax* gametocytes. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 251, 2014.

BERNA, A. Z. et al. Analysis of Breath Specimens for Biomarkers of *Plasmodium falciparum* Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 7, p. 1120–1128, 2015.

BERNA, A. Z. et al. Diurnal variation in expired breath volatiles in malaria-infected and healthy volunteers. **Journal of Breath Research**, v. 12, n. 4, 2018.

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). **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 747–756, 2000.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/novembro/16/lv-casos.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2022a.

BRASIL. **Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/novembro/17/lt-casos.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2022b.

BRAY, D. P.; WARD, R. D.; HAMILTON, J. G. C. The chemical ecology of sandflies (Diptera:Psychodidae). In: TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. (Eds.). . **Olfaction in vector-host interactions**. 1. ed. [s.l.] The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2009. p. 203–215.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: FIOCRUZ (Ed.). . **Flebotomíneos do Brasil**. V. 4 ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 257–274.

BRAZIL, R.; RODRIGUES, A.; FILHO, J. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology and Herpetology: Current Research**, v. 04, n. 02, p. 4–7, 2015.

BRILHANTE, A. F. et al. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in an area of ecotourism in Central-Western Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 39, 2015.

BUSULA, A. O. et al. Mechanisms of *Plasmodium*-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 961–973, 2017.

CARVALHO-SILVA, R. et al. Predominance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* DNA in *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an endemic area for leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. e32, 2022.

CARVALHO, B. M. et al. Entomological surveys of *Lutzomyia flaviscutellata* and other vectors of cutaneous leishmaniasis in municipalities with records of *Leishmania amazonensis* within the Bragança region of Pará State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 43, n. 1, p. 168–178, 1 jun. 2018.

CASANOVA, C. et al. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 113–115, fev. 2006.

CASANOVA, C. et al. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003620, mar. 2015.

CHELBI, I. et al. Enhanced attraction of sand fly vectors of *Leishmania infantum* to dogs infected with zoonotic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1–17, 2021.

CONVIT, J.; ULRICH, M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Biological research**, v. 26, n. 1–2, p. 159–166, 1993.

CORNET, S. et al. Malaria infection increases bird attractiveness to uninfected mosquitoes. **Ecology Letters**, v. 16, n. 3, p. 323–329, 2013.

CORREA, R. et al. Volatile organic compounds associated with *Plasmodium falciparum* infection *in vitro*. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 215, 2017.

DA ROCHA SILVA, F. B. et al. Influence of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection on the attractiveness of BALB/c mice to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–17, 2019.

DA SILVA, R. C. R. et al. Experimental transmission of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* to immunosuppressed mice through the bite of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) results in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 63, n. e81, p. 1–10, 2021.

DE MORAES, C. M. et al. Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. 11079–11084, 2014.

DE MORAES, C. M. et al. Volatile biomarkers of symptomatic and asymptomatic malaria infection in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 22, p. 201801512, 2018.

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. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 875, n. 2, p. 392–398, 2008.

DÍEZ-FERNÁNDEZ, A. et al. Mosquitoes are attracted by the odour of *Plasmodium*-infected birds. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 8, p. 569–575, 2020.

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. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2783–2788, 2013.

DORMONT, L.; BESSIÈRE, J. M.; COHUET, A. Human Skin Volatiles: A Review. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 5, p. 569–578, 2013.

DOUGHERTY, M.; HAMILTON, G. Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 12, p. 2657–2671, 1997.

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). **Research In Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 159–169, 1984.

FALCÃO, S. DE A. C. et al. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 287, 2016.

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

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

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

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

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

HAMILTON, J. G. C. et al. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 480–488, 1 dez. 2005.

HIRAMOTO, R. M. et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral, 2017. **BEPA**, v. 16, n. 182, p. 11–35, 2019.

INNOCENT, E.; GIKONYO, N. K.; NKUNYA, M. H. Repellency property of long chain aliphatic methyl ketones against *Anopheles gambiae* s.s. **Tanzania journal of health research**, v. 10, n. 1, p. 50–54, 2008.

IVAN, I. et al. *Plasmodium falciparum* Breath Metabolomics (Breathomics) Analysis as a Non-Invasive Practical Method to Diagnose Malaria in Pediatric. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 24–32, 2021.

KELLY, M. et al. Malaria parasites produce volatile mosquito attractants. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2015.

KOWACICH, D. et al. The egg and larval pheromone dodecanoic acid mediates density-dependent oviposition of *Phlebotomus papatasi*. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2020.

KWAK, J. et al. Major histocompatibility complex-regulated odortypes: Peptide-free urinary

volatile signals. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 1, p. 184–188, 2009.

LACROIX, R. et al. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. **PLoS Biology**, v. 3, n. 9, p. 1590–1593, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis - incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 385–395, 1968.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80–82, fev. 1997.

LOGAN, J. G.; BIRKETT, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, v. 63, p. 647–657, 2007.

MACHADO, V. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, 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, 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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 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). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 60, 2014b.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Attraction of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to possible biomarker compounds from dogs infected with *Leishmania infantum*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 2, p. 322–325, 2019.

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

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK KENDRICK, R.; ASHFORD, R. W. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences**, v. 190, n. 1100, p. 341–357, 1975.

NEVATTE, T. M. et al. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). **Scientific Reports**, 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*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9415, 2017.

O'SHEA, B. et al. Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 117–118, 2002.

OLSON, J. F. et al. Two compounds in bed bug feces are sufficient to elicit off-host aggregation by bed bugs, *Cimex lectularius*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 1, p. 198–205, 2016.

OMRANI, S. M. et al. Fabrication of an olfactometer for mosquito behavioural studies.

Journal of Vector Borne Diseases, v. 47, n. 1, p. 17–25, 2010.

PAHO. **Interactive Atlas of Leishmaniasis in the Americas: clinical aspects and differential diagnosis**. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 2020.

PALFRAMAN, M. J. et al. Sobralene, a new sex-aggregation pheromone and likely shunt metabolite of the taxadiene synthase cascade, produced by a member of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* species complex. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 20, p. 1921–1923, 2018.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier, 2012.

PITTS, R. J. et al. The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 26–34, 2014.

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

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

REBOUÇAS, A. et al. *Leishmania*-Induced Dendritic Cell Migration and Its Potential Contribution to Parasite Dissemination. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1268, 2021.

RÖCK, F. et al. Comparative analysis of volatile constituents from mice and their urine. **Journal of chemical ecology**, 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. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, p. 1–13, 2012.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0818–0825, 2007.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453–83, 2001.

SALGADO, V. R. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 241–251, 2016.

SCORZA, B. M. et al. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009366, 2021.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 2017, n. 660, p. 67–106, 2017.

SHIREY, R. E. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In: **Handbook of Solid Phase Microextraction**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 99–133.

SILVA, A. L. F. F. DA et al. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 453–458, 1990.

SMALLEGANGE, R. C. et al. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 8–10, 2013.

STANIEK, M. E. et al. eNose analysis of volatile chemicals from dogs naturally infected with

Leishmania infantum in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–19, 2019.

STANIEK, M. E.; HAMILTON, J. G. C. Odour of domestic dogs infected with *Leishmania infantum* is attractive to female but not male sand flies: Evidence for parasite manipulation. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 3, p. e1009354, 2021.

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

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

SUPELCO. **Solid Phase Microextraction Fiber Assemblies**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/t794123.pdf>. Acesso em: 22 maio. 2018a.

SUPELCO. **Selection Guide for Supelco SPME Fibers | Sigma-Aldrich**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html>. Acesso em: 18 maio. 2018b.

TAVARES, D. DA S. et al. Attraction of phlebotomine sandflies to volatiles from skin odors of individuals residing in an endemic area of tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–14, 2018.

TAVARES, D. S. et al. Determination and profiling of human skin odors using hair samples. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2964, 2019.

TITUS, R. G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 5, p. 545–555, set. 1985.

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

VERHULST, N. O. et al. Improvement of a synthetic lure for *Anopheles gambiae* using compounds produced by human skin microbiota. **Malaria Journal**, v. 10, p. 28, 2011.

VERHULST, N. O. et al. Relation between HLA genes, human skin volatiles and attractiveness of humans to malaria mosquitoes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 87–93, ago. 2013.

WHO. **Leishmaniasis: Situation and trends**. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em: 16 dez. 2021.

WITTING-BISSINGER, B. E. et al. Novel arthropod repellent, BioUD, is an efficacious alternative do deet. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 891–898, 2008.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAr.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

C E RT I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atratividade de hamster dourado (Mesocricetus auratus) infectado com Leishmania spp para flebotomíneos (Diptera:Psychodidae)", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 16/2018, sob a responsabilidade da Pesquisadora Flávia Benini da Rocha Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 24 de outubro de 2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2020
Espécie/linhagem/raça	hamster dourado
Nº de animais	23
Idade/Peso	4 semanas 140 g
Sexo	feminino
Origem	ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda – EPP

Araraquara, 24 de outubro de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA